8-4228

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

INRA-CRV
23. JUIL. 1991
UNITE CENTRALE DE DOCUMENTATION
- VERSAILLES -

VOL. 19
1990

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

LB-19

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

VOL. 19

1990

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

Sommaire

Sommaire 1

Introduction 3

Equipe associeé 5

Régulation des mécanismes enzymatiques 7

1°- Régulation biphasique dans les interactions ligand-récepteur. 9

2°- Interaction directe entre hormones et enzymes. 13

3°- Inhibition non Michaëlienne par le substrat. 15

4°- Le paramètre Iso non Michaëlien. 17

Régulation hormonale de la glycémie de l'abeille 19

1° Le glucagon. 21

2°- La mellittine. 29

Déterminismes chronobiologiques chez l'abeille 31

1°- la glycémie 33

2°- La lipémie 41

Toxicologie générale 43

1°- Théorie de la létalité. 45

2°- Interactions toxicologiques biphasiques. 59

3°- Toxicologie des sels organiques de cuivre (Thèse). 65

4°- Efficacité du sulfate de cuivre. 73

5°- Synergie entre l'ion cuivrique et l'amitraz. 81

6°- Action de la Toxine du Bacillus thuringiensis. 87

7°- Traumatologie biochimique végétale. 89

Interactions toxicologiques entre hôte et parasite 107

1°- Thèse E.P.H.E. 109

2°- Structure d'un hétéroside impliqué. 115

3°- Paramètres de vigueur des arbres. 125

...

Sommaire (suite)

Techniques biochimiques 12

1° Analyse des pigments photosynthétiques 129
2° Quantification des chromatogrammes 137
3° - spectro photo densitométrie - 139
4° - Spectres en phase solide. 141

Parution de Livres 151
1° La Création de la Vie ... 153
2° Si Dieu avait créé le Monde ... "

Compte-rendu Administratif 155
1° bilan des dépenses - 157
2° redéploiement de matériel - Etat des lieux - 158

Bilan des publications
par secteurs de collaborations
A - Avec l'Etranger 161
B - En France / + Laboratoire seul 161-16

INTRODUCTION

L'étude fondamentale de quelques uns des mécanismes enzymatiques et hormonaux qui sous-tendent la vie, se poursuit de manière, maintenant, plus focalisée vers les particularités cinétiques de certaines interactions inhibitrices et, activatrices originales, impliquées dans les processus de régulation.

Les applications toxicologiques ont conduit, entre autres, au dépôt de Brevets français, Européen et Américain, en Collaboration avec la Société Bénéchim. Parallèlement, les recherches se sont poursuivies quant à l'efficacité des sels organiques de cuivre, dans la lutte contre la Varroose de l'Abeille, et à leur toxicité vis à vis de l'hôte.

L'étude de l'interaction hôte/parasite, chez le végétal, a débouché sur la mise en évidence d'une réponse spécifique de l'hôte à l'inoculation par le pathogène.

Les recherches toxicologiques conceptuelles ont abouti à une théorie générale de la létalité, dont plusieurs applications expérimentales ont d'ores et déjà confirmé la validité.

Deux thèses ont été soutenues :

- L'une, par Mme Nectoux, sur la toxicologie des sels organiques du cuivre, chez l'abeille
- L'autre par Mme Daurade, sur la réponse biochimique du Pin sylvestre à l'inoculation par le pathogène Ceratocystis bruneociliata et à l'attaque par le scolyte vecteur : Ips sexdentatus

Les programmes se poursuivent en collaboration avec 10 Université différentes, Françaises et Etrangères. Trois autres directions de thèses sont en cours. (cf. page suivante)

INTRODUCTION

L'étude fondamentale de quelques cas des mécanismes enzymatique et hormonale [illegible] se poursuit de manière, maintenant, plus [illegible] particularités cinétiques de certaines [illegible] activatrices originales, impliquées dans les processus de régulation.

Les applications toxicologiques ont conduit, entre autres, au dépôt de Brevets français, Européen et Américain, en collaboration avec la Société Bérékian. Parallèlement, les recherches se sont poursuivies quant à l'efficacité des sels organiques de cuivre, dans la lutte contre la Varroase de l'Abeille, et à leur toxicité vis à vis de l'Abeille.

L'étude de l'interaction hôte/parasite, chez le végétal, a débouché sur la mise en évidence d'une réponse spécifique de l'hôte à l'inoculation par le pathogène.

Les recherches théoriques, conceptuellement axées à une théorie générale de la létalité, dont plusieurs applications expérimentales ont d'ores et déjà confirmé la validité.

Deux thèses ont été soutenues.

- L'une par Mme Nectoux, sur la toxicologie des sels organiques de cuivre, chez l'abeille.
- L'autre par Mme Daurade, sur la réponse biochimique du Pin sylvestre à l'inoculation par le pathogène Ceratocystis [illegible] et à l'attaque par le scolyte vecteur : Ips sexdentatus.

Les programmes se poursuivent en collaboration avec 10 Université différentes, françaises et étrangères. Trois autres directions de thèses sont en cours. (cf. page suivante)

EQUIPE ASSOCIÉE*

AUX RECHERCHES DU LABORATOIRE

Responsable : Professeur M. BOUNIAS D.R. (INRA et Université d'Avignon)

Agent permanent*: Mme M.H. DAURADE (thèse en cours)

Associés Nationaux :

Professeur C.P. Vivarès (Univ. Montpellier / Clermont Ferrand)
DR. R. Moreau (Univ. Bordeaux)
Dr. C. Fleché Seban (CNEVA - Nice) / Professeur P. Vasseur (Univ. Metz) - (1 Thèse en cours M.N. Bendahou -
Dr. A. Bonaly (Univ. Paris XI)
M. Y. Lizzi (Univ. d'Avignon)

Associés Internationaux.

Dr. I. Kruk (Univ. Szczecin, Pologne)
Dr. M.R.J. Morgan (Univ. Lancaster, G.B.)
Prof. Dr. V. Maier (Univ. Ulm, RFA)
Prof. Dr. D. Popeskovic (Univ. Belgrade, Y.) (1 Thèse en cours Mme M. Debevec -
Dr. A.M. Vargas (Univ. Grenade, Esp.)

* depuis mars et mai 1990, respectivement, le LBC ne comporte plus de poste d'ingénieur ni de secrétariat

RÉGULATION DES MÉCANISMES ENZYMATIQUES

1º Régulation Biphasique

J. Enzyme Inhibition, 3, 323-326.

2º Interaction directe entre hormones et enzymes

Collaboration avec l'Université de Bordeaux
(Dr. R. Moreau)
Action de l'insuline d'insecte sur la tréhalase

3º Inhibition non-Michaëlienne par excès de Substrat.

Collaboration avec l'Université de Grenade,
Dept. de Biochimie et Biologie Moléculaire

(DR. A. M. Vargas)

4º Les propriétés du paramètre I_{50}

Collaboration avec l'Université de Lancaster
Laboratoire d'enzymologie moléculaire

(DR. M. R. J. Morgan)

9

J. Enzyme Inhibition, 1990, Vol. 3, pp. 323–326
Reprints available directly from the publisher
Photocopying permitted by license only

© 1990 Harwood Academic Publishers GmbH
Printed in the United Kingdom

1°

BIPHASIC REGULATION IN LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS

MICHEL BOUNIAS

Laboratory of Biochemistry, University and INRA-Avignon, B.P. 91, F84140 Montfavet, France.

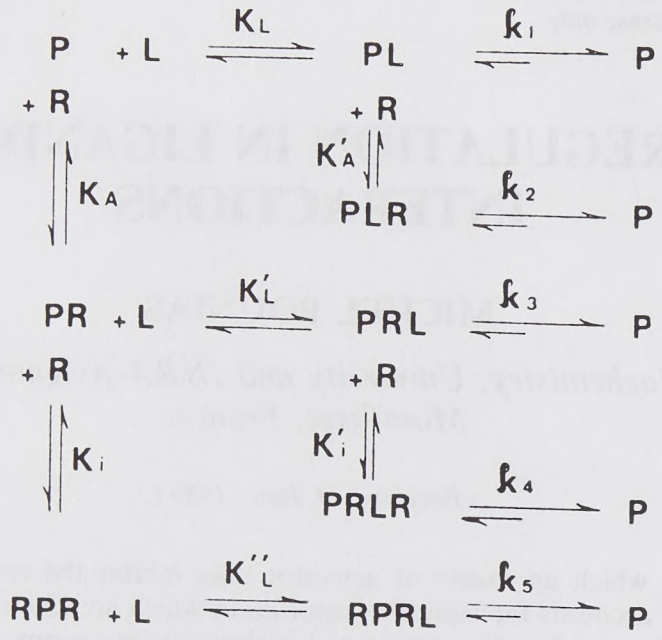
(Received 24 June, 1989)

A model is examined in which an excess of activator may inhibit the response in a ligand-receptor interaction. The equation accounts for biphasic responses in which an effector stimulates the response at low concentrations and then inhibits the response at higher concentrations, towards a limit that can be higher, identical or lower than the initial value. Reciprocal features could be observed according to the values of the involved parameters. A maximum 7 dimensions can be found in the space of the parameters of the equation which is of the simple form: $v = (A + B + C).\ S^n/(H + S^n)$.

KEY WORDS: Ligand-receptor interactions, biphasic regulation.

INTRODUCTION

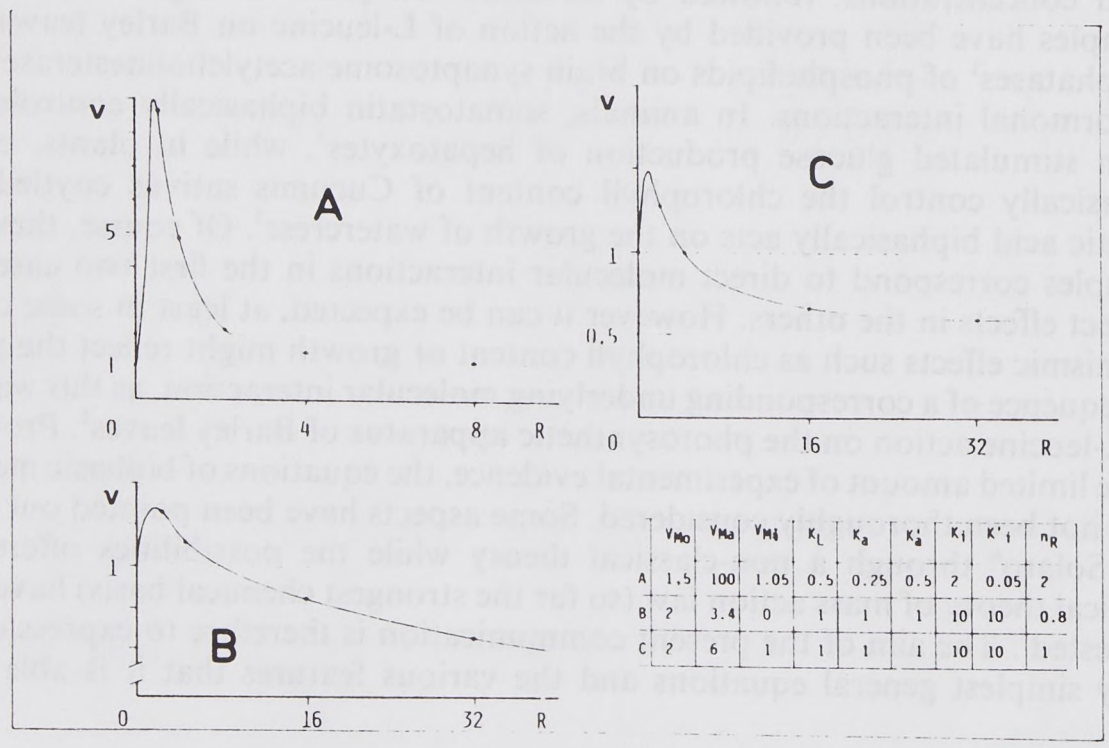
A biphasic regulation process occurs when a ligand acts on a receptor in two opposite ways according to its concentration. Although such cases have not been very often described, the most well known among these involve a first activation phase, at low ligand concentrations, followed by an inhibition phase at higher concentrations. Examples have been provided by the action of L-leucine on Barley leaves alkaline phosphatases[1] of phospholipids on brain synaptosome acetylcholinesterase[2] but also by hormonal interactions. In animals, somatostatin biphasically controls the glucagon stimulated glucose production of hepatoxytes[3], while in plants, cytokinins biphasically control the chlorophyll content of Cucumis sativus coytledons[4] and L-lactic acid biphasically acts on the growth of watercress[5]. Of course, these various examples correspond to direct molecular interactions in the first two cases, and to indirect effects in the others. However it can be expected, at least in some cases, that organismic effects such as chlorophyll content or growth might reflect the peripheric consequence of a corresponding underlying molecular interaction, as this was the case for L-leucine action on the photosynthetic apparatus of Barley leaves[1]. Probably due to the limited amount of experimental evidence, the equations of biphasic mechanisms have not been thoroughly considered. Some aspects have been pointed out by Shiner and Solaro[6] through a non-classical theory while the possibilities offered by the classical theory of mass action law (so far the strongest chemical basis) have just been suggested[7]. The aim of the present communication is therefore to express one of the likely simplest general equations and the various features that it is able to cover.



SCHEME 1 Molecular interactions involved in biphasic regulation. K_L etc are dissociation constants; k_1 etc are kinetic constants. P is product or/and response.

MODEL AND RESULTS

A ligand (L) (substrate or hormone) binds a receptor (P) (enzyme or hormonal receptor) giving an active complex (PL). The regulator (R) binds the complex (PL) and eventually the free receptor, leading to the possible ternary complexes (PLR) and (PRL). Lastly, these complexes in turn bind the regulator, leading to the quaternary complexes ($PRLR$) or ($RPRL$) (scheme 1). Let k_1, k_2, k_3, k_4, k_5 the kinetic constants of the respective responses of all five complexes and K_L K_a, K_a', K_i, K_i' the respective



	V_{Mo}	V_{Ma}	V_{Mi}	K_L	K_a	K_a'	K_i	K'_i	n_R
A	1.5	100	1.05	0.5	0.25	0.5	2	0.05	2
B	2	3.4	0	1	1	1	10	10	0.8
C	2	6	1	1	1	1	10	10	1

FIGURE 1 Three types of biphasic curves obtained with the parameters given in arbitrary units. Asymptotic limits are: identical to initial level (A), zero (B) or lower than initial level i.e. 0.5 (C).

dissociation constants of (PL), (PR), (PLR), (RPR) and $(PRLR)$, and K_L', K_L'' those of (PRL) and $(RPRL)$. Then, assuming, for simplification, that $k_2 = k_3$ and $k_4 = k_5$ (or that (PLR) and $(PRLR) = (RPRL)$, the initial rates of the responses are:

$$v_o = -d(PL)/dt = k_1(PL) \tag{1}$$

$$v_a = -d(PLR)/dt = k_2(PLR) \tag{2}$$

$$v_i = -d(PRLR)/dt = k_4(PRLR) \tag{3}$$

Then defining the corresponding maximum responses $V_{Mo} = k_1(P_{tot})$, $V_{MA} = k_2(P_{tot})$, P_{tot} = sum of the molecular species containing (P), the representative equation of the resulting rate is:

$$V_R = 1/N \cdot L/(K_o + L) \cdot [V_{Mo} + (R/K_A')\, V_{MA} + (R^2/K_A' K_i')\, V_{Mi}] \tag{4}$$

$$\text{where } N = 1 + R/K_A' + R^2/K_A' K_i' \tag{4-1}$$

$$K_o = K_L\, |1 + (R/K_a)(1 + R/K_i)|/|1 + (R/K_a')(1 + R/K_i')| \tag{4-2}$$

It is noteworthy that when $K_a = K_a'$, $K_i = K_i'$, then $K_o = K_L$.

Lastly, (L) and (R) can affect the respective Hill coefficients n_L and n_R, possibly $\neq 1$. .

The limits of v_R are the following:

$$\text{For } R \to 0,\ v_R \to v_o = V_{Mo} \cdot L/(K_L + L) \tag{5-1}$$

For $R \to \infty$, $v_R \to v_\infty = V_{Mi} \cdot L/(K_L \cdot K_a' \cdot K_i/K_a \cdot K_i + L)$ that is, since $K_a'/K_a = K_L'/K_L$ and $K_i'/K_i = K_L''/K_L$, lim. $v_R\,(R \to \infty) = V_{Mi} \cdot L/(K_L'' + L)$ (5-2)

The corresponding limits of K_o may be noted: For $R \to 0$: $K_o \to k_L$. For $R \to \infty$: $K_o \to K_L''$.

The model can be representative of an activation at low doses ($k_2 > k_1$) followed by an inhibition at higher doses ($k_4 < k_1$) towards a limit that can be $v_\infty = 0$ ($k_4 = 0$), $v_\infty = v_o$ ($k_4 \neq 0$ and $V_{M_i}/V_{Mo} = (K_L'' + L)/(K_L + L)$), or $v_\infty \gtrless v_o$ ($k_4 \neq 0$ and v_∞ as in equation (5-2)).

Examples are illustrated in Figure 1. It should be emphasized that symmetrical features, i.e. inhibition at low ligand doses followed be reactivation at higher doses, can be accounted for using the same model, but assuming $k_2 < k_1$, $k_4 > k_1$.

The described model represents a simple extension of the Botts and Morales[8] scheme and can be considered, because of its simplicity, as one of the simplest, and thus of the most likely models accounting for biphasic responses. However, the parameters space contains as many as 7 independent dimensions in the more general case, including the resulting Hill coefficient n_R, so that a topologic study is needed in order to search for a rational way of calculating the various involved parameters.

Acknowledgements

The author wishes to acknowledge the kind encouragement and advice of Professors René Thom and Henri Pacheco, and the excellent assistance of Mrs. Bareste. Many thanks are due to Dr. R.H. Davies for his kind revision of the manuscript and helpful suggestions.

References

1. Bounias, M. and Pacheco, H. (1972). *C.R. Acad. Sc.* (Paris), **275D**, 201–204.
2. Tsakiris, S. (1985). *Z. Naturforsch.*, **40c**, 97–101.
3. Rosa, J. Fister, V. and Rosa, J. (1982) *Proc. 12th Cong. Un. Yug. Physiol. Soc.*, Sept. 1982, 188–190.
4. Corradi, M.G. (1983). *Acta Nat. Ateneo Parmense*, **19**, 89–92.
5. Young, D.C. (1987). *Braz. Pedido PI BR 86 01*, **867**, 52.
6. Shiner, J.S. and Solaro, R.J. (1981) *Biophys. Chem.*, **13**, 291–306.
7. Keleti, T. (1986). *Akademiai Kiado, Budapest* 278,
8. Botts J. and Morales M. (1953). *Trans. Faraday Soc.*, **49**, 696–707.

2° INTERACTION DIRECTE ENTRE HORMONES ET ENZYMES : ACTIVATION DE LA TRÉHALASE DU CORPS GRAS DE Tenebrio molitor PAR UN PEPTIDE INSULINO-SEMBLABLE

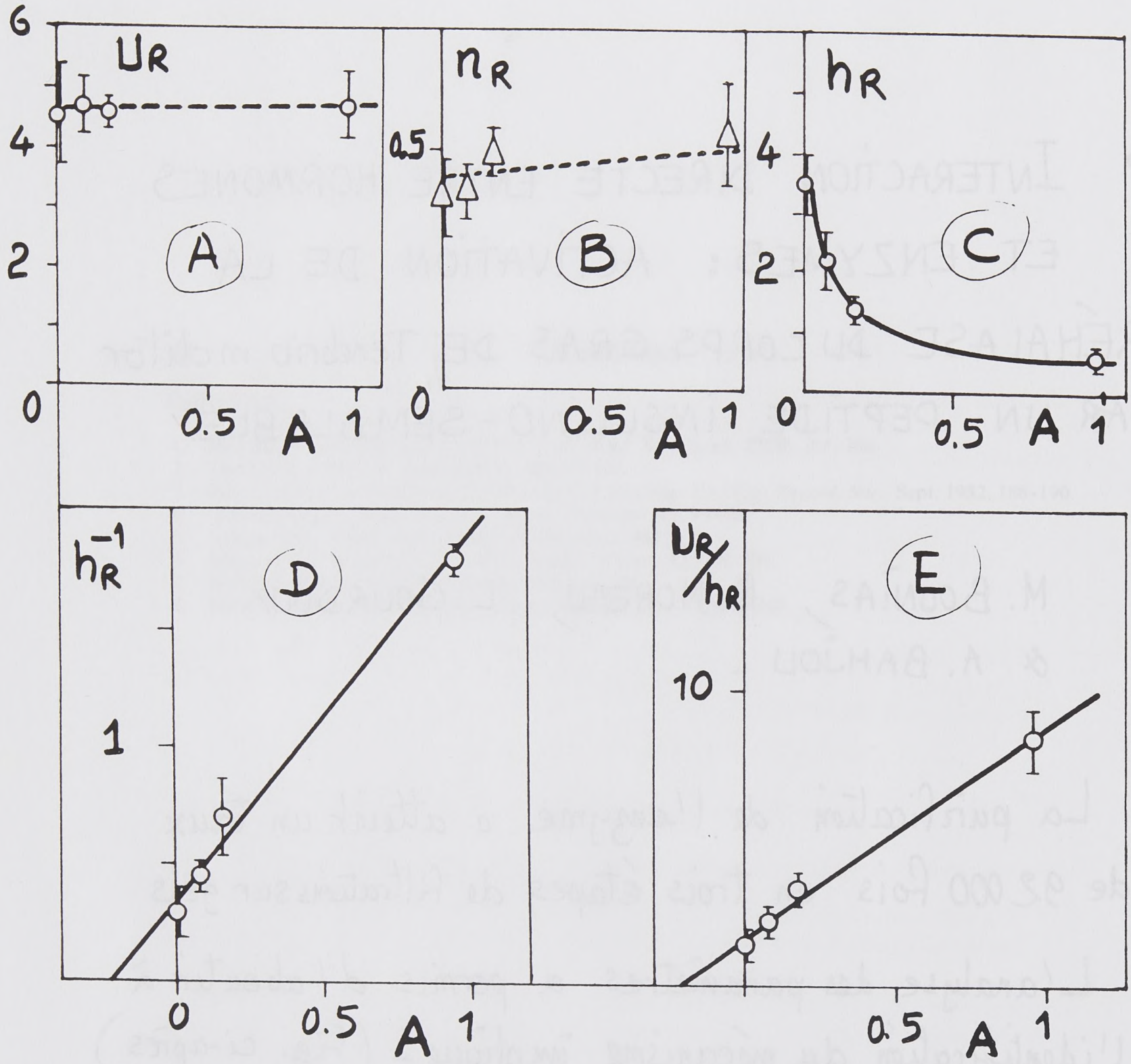
M. BOUNIAS, R. MOREAU, L. GOURDOUX & A. BAHJOU -

La purification de l'enzyme a atteint un taux de 92 000 fois en trois étapes de filtrations sur gels

L'analyse des paramètres a permis d'aboutir à l'identification du mécanisme impliqué - (fig. ci-après)

L'utilisation d'un anti-sérum anti-insuline de l'insecte a permis de confirmer la nature de l'interaction moléculaire directe entre l'hormone et l'enzyme -

Aussitôt l'ensemble des calculs terminés, le manuscrit sera rédigé (projet de publication : fin 1991)



La linéarité des relations de h_R^{-1} et du rapport U_R/h_R en fonction des concentrations en activateur (A) permet d'identifier formellement la nature du mécanisme d'activation.

the Journal of Biological Chemistry : manuscrit accepté.

3°

Inhibition by Substrate of Fructose 1,6-Bisphosphatase Purified from Rat Kidney Cortex

CALCULATION OF THE KINETIC CONSTANTS OF THE ENZYME*

(Received for publication, March 26, 1990)

Alberto M. Vargas‡, Maria M. Sola‡§, and Michel Bounias¶

From the ‡Departamento de Bioquimica y Biologia Molecular, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, Granada 18001, Spain and the ¶INRA and University of Avignon, Laboratory of Biochemistry, B.P. 91, Montfavet F 84140, France

Fructose 1,6-bisphosphatase is a typical enzyme that is severely inhibited by its own substrate. This makes it difficult to determine all the parameters involved in its kinetics. It has been shown recently that if V_m is satisfactorily estimated the remaining parameters can be determined using the Hill plot (Bounias, M. (1988) *Biochem. Int.* 17, 147–154). The enzyme has been purified from rat kidney cortex nearly to homogeneity, and its kinetic constants have been calculated using a rigorous algebraic method. The most interesting result is that the substrate is unable to bind to the free enzyme as an inhibitor, which indicates that the enzyme lacks an allosteric site for hexose bisphosphate.

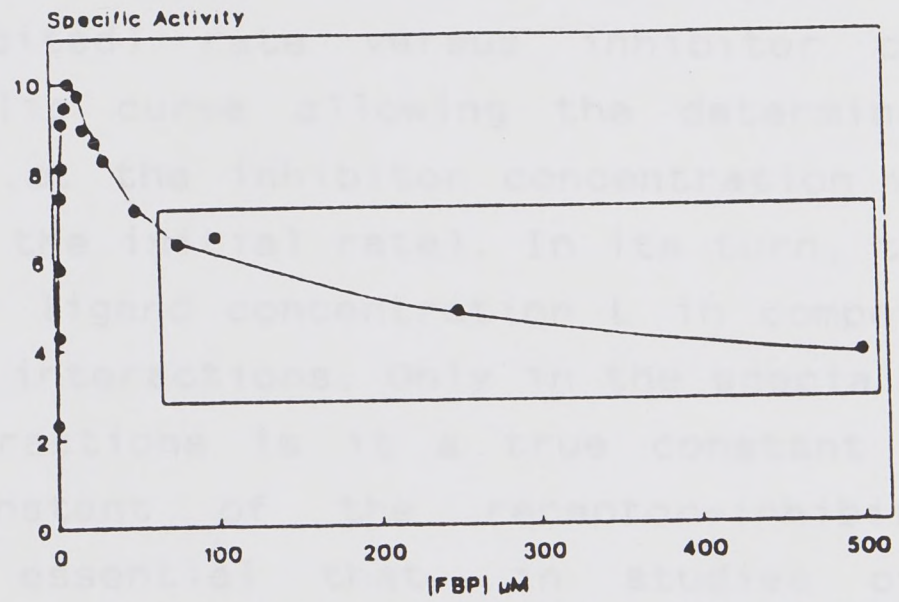


FIG. 2. **Inhibition by substrate of rat kidney cortex fructose 1,6-bisphosphatase (*FBP*).** The activity was measured spectrophotometrically at pH 7.2 coupled to the reduction of $NADP^+$. The *framed part* of the graph does not follow the general equation. ✱

✱ Au cours de 1990, un nouveau mécanisme moléculaire d'inhibition limitée, par le substrat, a été envisagé et mis en équation. La modélisation mathématique est en cours, et semble d'ores et déjà expliquer la déviation observée dans la réponse.

40

USE AND MISUSE OF THE INHIBITION PARAMETER I50 IN THE INTERPRETATION OF LIGAND-RECEPTOR INTERACTIOINS : A THEORETICAL TREATMENT

M.R.J. MORGAN* and M. BOUNIAS**

* Molecular Enzymology Laboratory, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ, England

** Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP91, 84143 Montfavet Cedex, France

SUMMARY

In studies of ligand-receptor interactions, plotting the resultant (inhibited) rate versus inhibitor concentrations gives a hyperbolic curve allowing the determination of the parameter I_{50} (i.e. the inhibitor concentration which gives a 50% reduction in the initial rate). In its turn, this parameter is a function of ligand concentration L in competitive, mixed or uncompetitive interactions. Only in the special case of non-competitive interactions is it a true constant equal to the dissociation constant of the receptor-inhibitor complex, $I_{50}=K_i$. It is essential that, in studies of inhibition phenomena, values of I_{50} should be regarded as variables rather than constants. Comparisons of inhibitor action on the basis of I_{50} values should be confined to cases where a standardised value of ligand concentration has been explicitly adopted.

Manuscrit en préparation pour : "Bio-Math."

RÉGULATION HORMONALE DE LA GLYCÉMIE DE L'ABEILLE

Collaboration avec l'Université de ULM (RFA):

Prof. Dr. Volker MAIER, Directeur du "Klinikum"

1º Le Glucagon

- Diabete & Metabolisme, 16, 428-434

2º L'insuline et son apparenteé : la Mellittine

Z. Biol. Chem., 371, 771.

21

Diabete & Metabolisme (Paris)
1990, *16*, 428-434

1°-

GLUCAGON AS A NON SPECIES-SPECIFIC REGULATOR OF THE GLYCAEMIA IN HONEYBEE *(APIS MELLIFICA)*

Le glucagon est un régulateur de la glycémie non spécifique de l'espèce chez l'abeille

V. MAIER *, J. FUCHS *, E.F. PFEIFFER *, M. BOUNIAS **

* *Abteilung Innere Medizin I, Universität Ulm, D-7900 Ulm*
** *Laboratoire de Biochimie, Université d'Avignon & INRA, B.P. 91, F-84140 Montfavet*

RÉSUMÉ

Il est admis que les hormones agissant chez les vertébrés sont très bien conservées dans l'évolution des espèces. La présence d'insuline et de glucagon chez les insectes a déjà été suggérée au début des années 1960-70. Dans cette étude, des abeilles vivent dans une ruche artificielle, dans un laboratoire, sous des conditions standardisées. Dans le laboratoire français, ces conditions standardisées étaient possibles car seules les abeilles ouvrières sortant des alvéoles de la ruche étaient utilisées dans l'étude. Il semblait intéressant d'introduire un modèle in vivo dans lequel un animal est ponctionné au niveau du tergum III dans le but de gagner 1 µl de lymphe utilisant un capillaire en verre. Pour la première fois, il est possible de ponctionner un animal à trois reprises. Les principaux sucres contenus dans la lymphe étaient silylatés et déterminés par chromatographie gazeuse dans le laboratoire allemand et par nano chromatographie en couche mince dans le laboratoire français.

0-500 ng de glucagon d'origine porcine et la même quantité de glucagon purifié d'abeille étaient injectés aux animaux, et l'action sur les glucides a été étudiée pendant 2 heures.

Comme pour les vertébrés, le glucagon semble réguler en partie le métabolisme des glucides chez les invertébrés, bien que ce métabolisme soit complètement différent.

En conclusion, le glucagon pourrait être une hormone clé de la dégradation des réserves en glycogène.

Mots clés : Abeillle. Glucagon. Glucides de la lymphe.

SUMMARY

It is known that hormones wich exist in vertebrates are very old in respect to evolution. The presence of insulin and glucagon in insects had already been suggested in the early sixties. In this study honeybees are living in an "artificial hive" in the German laboratory under exactly standardized conditions. In the French laboratory standardized conditions yielded because only emerging worker bees were used i.e. those which were just sliping from the honeycomb alveoli. It seemed of interest to introduce an in vivo model in which one animal is punctunred at tergum III in order to gain 1 µl hemolymph using a glass capilette. *For the first time it is possible to puncture one animal three times. The main sugars in the hemolymp were silylated * and determined by gas chromatography in the German resp. by nano thin layer chromatography in the French laboratory.

0-500 ng porcine glucagon resp. the same amount of purified bee glucagon were injected to the animals and the action on carbohydrates observed during 2 hours.

Similar to the action of glucagon in vertebrates, carbohydrate metabolism although completely different, appears to be regulated in part in this invertebrate stem. It is concluded that glucagon may represent a key hormone for degradation of the glycogen stores.

Key words : Honeybee *(Apis mellifica)*. Glucagon. Hemolymph carbohydrates.

Reçu le 12-09-1989 ; *révisé le* 21-05-1990.

Reprints requests : U. MAIER, adress above.

INTRODUCTION

Besides the action of insect-specific factors regulating complex carbohydrate metabolism, several authors claimed that insects possess classical vertebrate peptide hormones (for review see : 1). The origins of the control of the endocrine system must have been present in earlier presumably less complicated forms. Detection of non-mammalian hormonal substances induces principal difficulties : the cross reactivity of antibodies is not necessarily relevant to invertebrates. Thus the activity should be ascertained by purification, bioassay and morphological analysis at the same experimental subject. Although there is substantial evidence (2) for the existence of glucagon-like peptides in insects, in no case all prerequisites were fulfilled. Regulating hormones seem to be localized in the neurosecretory system (3, 4, 5, 6, 7).

Carbohydrate metabolism in insects is poorly understood. The present paper describes experiments in which glucagon is injected to honeybees. The French laboratory used porcine glucagon whereas the German laboratory used a purified fraction of endogenous glucagon (8). Afterwards carbohydrate levels in hemolymph were determined.

MATERIALS AND METHODS

The honeybee is a complex social bee with well-defined behaviour, physiological and anatomical caste differentiation. The numerically predominant worker caste is able to undergo different functions during their life time. Bees born in spring and summer have duties which differ from those born in autumn. Therfore only the first group was used in our experiments.

Emerging "French workerbees" *(Apis mellifica mellifica)* were collected on the brood combs from operculated alveoli in order to keep them free of any feeding-induced heterogeneity. During these experiments, 524 bees were used and their individual weights were 114.8 ± 2.75 mg, calculated from 55 groups of 5 to 10 bees. For each treatment, one homogeneous batch of bees coming from one single "spiral" turn of eggs-laying was used. Variations between batches coming from different combs do not affect the uniformity of the responses within each batch.

"German workerbees" *(Apis mellifica carnica)* were kindly provided by Dr. H. Herlitzius (Department of Animal Ecology and Morphology, University of Ulm). It was necessary to know the exact age (14 days) in an observation hive. They were caught with a special pincette from the hive and anaethetized by CO_2.

Preparation of endogenous glucagon

Glucagon was isolated from 13.4 kg honeybees (8). After homogenization in acid ethanol, gelfiltration and HPLC (C-18) reversed phase chromatographies were performed. A substance with the molecular weight of 9 000 D reacting only in the C-terminal assay for the glucagon was used for injection in honeybees.

Artificial hive

2 days prior to the experiments planned, "G honeybees were transfered in an especially cons artificial "bee house" in order to acclimatize (9). A circulating inside continuously. Temperature was c at 30 °C ± 1 °C. The temperature gradient b bottom and uper sides was only 0.5 °C. Air hu was 60-70 % due to evaporation from a water tank

Nutrition and fasting were controlled from o without any disturbance of the stock. On the out each cage four chambres were located to which th might migrate if the small slides were opened. They attracted by light falling inside. Then they were thetized by CO_2. Using this principle experiments performed without any disturbance of the whole g

Nutrition

Animals were fed ad libitum with Api-Invert kerfabrik Franken GmbH, Ochsenfurt/Main, Germ This mixture consisted of one third fructose, glucose sucrose each. No additional water is necessary. M and Ritter (10) state that honeybees prefer this mi from other artificial nutritional sources.

Bees were gathered by 10 put into small wo boxes which were replaced into the artificial hive. ambient temperature was 30 °C without nutrition. procedure was intended to standardise body tempera and the animals activity.

Haemolymph sampling and preparation of carbohydrate analysis

Hormones were injected in the dorsal aorta u microsyringes. Volumes of 0.5 µl were used in emerg bee, and 1 µl in older bees. Saline was injected in b cases as control. For puncturing, bees were caught ag without being anaesthetized. Haemolymph was puncte out from the dorsal aorta using Hamilton microsyring If necessary the wound was sealed with a mixture beeswax and colophonium. Three successive puncturi of haemolymph were possible at 0, 1 hr, 2 hrs follow injections to "German" bees. After that, no more h molymph could be punctured without damage wh would adversely affect the physiological meaning results. "French" bees were punctured only once, a one specific batch of animals was used for each ti after injections and each dose. Samples from individu bees were collected and added the same volume of ice-cold mixture of ethanol and pyridine (4 : 1; v/v then centrifuged for 5 min at 3 000 × g for pelletti proteins and other macromolecules. The supernatan were directly used for thin layer chromatography (TLC French Laboratory) or added 10 mM methyl-α-D-gluco pyranosid (Fluka, CH-Buchs) as internal standard fo gas chromatography studies (GC : German Laboratory After short centrifugation the supernatant was given int derivative-vessels and dried in an dessiccator.

Analytical procedure in the German laboratory by gas chromatography (GC)

Carbohydrates from hemolymph were silylated by addition of 100 µl Sil-A (trimethychlorosilan, hexame thyldisilan and pyridin ; (1 : 3 : 9) ; Sigma Comp., Deisenhofen, Germany). The reaction time was 2 hours at room temperature ; 2 µl of the derivatives were injected

into the gaschromatograph (Vega 6000, Carlo Erba Comp., Milano, Italy). Separation of carbohydrates was achieved using a prepacked column SE 30 on Chromosorb WAW 80 — 100 mesh (Chromopack Comp., Müllheim, Germany) using a temperature program. Carbohydrates were detected by FID and concentrations integrated by Mega Sp 2490 (Carlo Erba Comp., Milano, Italy) using the relative amount of the peak area to the internal standard (9).

Analytical procedure in the French laboratory by thin layer chromatography (TLC)

Crude hemolymph was pretreated as described above. High performance TLC quantitative methods were used for carbohydrate determinations (11, 12). The sensitivity of carbohydrate detection using the reagent of BOUNIAS (13) allowed accucate determinations of the glycemia from the equivalent of 0.2 µl of hemolymph.

Statistical methods

Means were compared using the "t"-test. Correlation coefficients are designated by ρ and the regression slopes (d) were calculated using the least rectangle method for 2 aleatory variables. The standard deviation of slopes was given by the relation :

$$SD = \pm \sqrt{[(d/\rho)^2 - d^2]/(N-2)}.$$

N = number of pairs of data.

RESULTS

Action of vertebrate glucagon (French laboratory)

Only trehalose and glucose were present in emerging bees. Although all workers were daughters from the same queen, there remains some fluctuations in the variability between the bees taken from various combs. For this reason, all samples used for studying the effects of a same dose injected at different times after injection were chosen from the same side of one comb. Relative units were thus used for comparisons, in order to quentch the variability between different combs.

The average initial values and their standard deviations determined at time zero for not injected bees, were calculated for the whole series, including saline batches (dose zero) and the five other batches corresponding to the various doses of glucagon. Using the mean initial values of each series , the results were the following (n = 6) : Glucose = 5.39 ± 2.45 mM ; Trehalose = 17.0 ± 5.90 mM. *Table I* gives the variations of carbohydrates concentrations from 10 mn to 3 hours after injections. Significant increases are observed mainly with 50 and 100 ng glucagon injected per bee, and more

TABLE I. — *(French laboratory)* Action of porcine glucagon after in vivo injection of different concentrations into single honeybees. Means ± SD are given in relative units (see text) for 4 determinations

Time after injection (min)	*Dosis per animal (ng)* 0	10	50	100	400	500
Trehalose :						
0	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.60	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.30
10	1.01 ± 0.16	1.30 ± 0.17	1.75 ± 0.41	1.30 ± 0.23	1.11 ± 0.11	0.48 ± 0.06$^{b}_{d}$
30	1.18 ± 0.24	1.15 ± 0.13	1.85 ± 0.57	2.04 ± 0.21$^{a}_{c}$	1.12 ± 0.04	0.67 ± 0.26
60	0.87 ± 0.08	0.92 ± 0.26	2.61 ± 0.41$^{a}_{c}$	1.13 ± 0.13		0.77 ± 0.20
90	0.79 ± 0.08	1.29 ± 0.10	1.58 ± 0.48	1.04 ± 0.19	0.79 ± 0.17	0.35 ± 0.09$^{b}_{d}$
120	0.75 ± 0.42	0.20 ± 0.07	0.84 ± 0.39	0.90 ± 0.13	1.49 ± 0.27^{a}	1.24 ± 0.20
180	0.90 ± 0.08	0.62 ± 0.05	1.00 ± 0.27	0.54 ± 0.10	0.68 ± 0.08	0.53 ± 0.34
Glucose :						
0	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.31
10	1.29 ± 0.11	1.35 ± 0.21	3.82 ± 1.25$^{a}_{c}$	2.76 ± 0.20$^{a}_{c}$	1.43 ± 0.57	0.65 ± 0.11
30	1.83 ± 0.74	0.76 ± 0.07	3.88 ± 1.02^{a}	2.59 ± 0.26^{a}	1.64 ± 0.25^{a}	0.53 ± 0.34
60	1.38 ± 0.08	1.78 ± 0.80	4.05 ± 1.31^{a}	1.96 ± 0.75		1.90 ± 0.82
90	0.65 ± 0.08	1.96 ± 0.14$^{a}_{c}$	3.99 ± 2.12$^{a}_{c}$	4.22 ± 0.69$^{a}_{c}$	1.13 ± 0.24	0.95 ± 0.18
120	1.64 ± 0.33	0.48 ± 0.10	4.67 ± 1.50$^{a}_{c}$	2.80 ± 0.28$^{a}_{c}$	1.70 ± 0.16^{a}	1.08 ± 0.92
180	1.33 ± 0.22	1.03 ± 0.09	2.87 ± 0.86	1.88 ± 0.33	1.39 ± 0.25	1.75 ± 0.34

Comparison from time zero at each dose ($P < 0.05$) :
(^{a}) significant increase. (^{b}) significant decrease.
Comparison from dose zero at each time ($P < 0.05$) :
(^{c}) significant increase. (^{d}) significant decrease.

INTRODUCTION

Besides the action of insect-specific factors regulating complex carbohydrate metabolism, several authors claimed that insects possess classical vertebrate peptide hormones (for review see : 1). The origins of the control of the endocrine system must have been present in earlier presumably less complicated forms. Detection of non-mammalian hormonal substances induces principal difficulties : the cross reactivity of antibodies is not necessarily relevant to invertebrates. Thus the activity should be ascertained by purification, bioassay and morphological analysis at the same experimental subject. Although there is substantial evidence (2) for the existence of glucagon-like peptides in insects, in no case all prerequisites were fulfilled. Regulating hormones seem to be localized in the neurosecretory system (3, 4, 5, 6, 7).

Carbohydrate metabolism in insects is poorly understood. The present paper describes experiments in which glucagon is injected to honeybees. The French laboratory used porcine glucagon whereas the German laboratory used a purified fraction of endogenous glucagon (8). Afterwards carbohydrate levels in hemolymph were determined.

MATERIALS AND METHODS

The honeybee is a complex social bee with well-defined behaviour, physiological and anatomical caste differentiation. The numerically predominant worker caste is able to undergo different functions during their life time. Bees born in spring and summer have duties which differ from those born in autumn. Therfore only the first group was used in our experiments.

Emerging "French workerbees" *(Apis mellifica mellifica)* were collected on the brood combs from operculated alveoli in order to keep them free of any feeding-induced heterogeneity. During these experiments, 524 bees were used and their individual weights were 114.8 ± 2.75 mg, calculated from 55 groups of 5 to 10 bees. For each treatment, one homogeneous batch of bees coming from one single "spiral" turn of eggs-laying was used. Variations between batches coming from different combs do not affect the uniformity of the responses within each batch.

"German workerbees" *(Apis mellifica carnica)* were kindly provided by Dr. H. Herlitzius (Department of Animal Ecology and Morphology, University of Ulm). It was necessary to know the exact age (14 days) in an observation hive. They were caught with a special pincette from the hive and anaethetized by CO_2.

Preparation of endogenous glucagon

Glucagon was isolated from 13.4 kg honeybees (8). After homogenization in acid ethanol, gelfiltration and HPLC (C-18) reversed phase chromatographies were performed. A substance with the molecular weight of 9 000 D reacting only in the C-terminal assay for the glucagon was used for injection in honeybees.

Artificial hive

2 days prior to the experiments planned, "German" honeybees were transfered in an especially constructed artificial "bee house" in order to acclimatize (9). Air was circulating inside continuously. Temperature was constant at 30 °C ± 1 °C. The temperature gradient between bottom and uper sides was only 0.5 °C. Air humidity was 60-70 % due to evaporation from a water tank inside.

Nutrition and fasting were controlled from outside without any disturbance of the stock. On the outsite of each cage four chambres were located to which the bees might migrate if the small slides were opened. They were attracted by light falling inside. Then they were anaesthetized by CO_2. Using this principle experiments were performed without any disturbance of the whole group.

Nutrition

Animals were fed ad libitum with Api-Invert (Zukkerfabrik Franken GmbH, Ochsenfurt/Main, Germany). This mixture consisted of one third fructose, glucose and sucrose each. No additional water is necessary. Müller and Ritter (10) state that honeybees prefer this mixture from other artificial nutritional sources.

Bees were gathered by 10 put into small wooden boxes which were replaced into the artificial hive. The ambient temperature was 30 °C without nutrition. This procedure was intended to standardise body temperature and the animals activity.

Haemolymph sampling and preparation of carbohydrate analysis

Hormones were injected in the dorsal aorta using microsyringes. Volumes of 0.5 µl were used in emerging bee, and 1 µl in older bees. Saline was injected in both cases as control. For puncturing, bees were caught again without being anaesthetized. Haemolymph was punctered out from the dorsal aorta using Hamilton microsyringes. If necessary the wound was sealed with a mixture of beeswax and colophonium. Three successive puncturings of haemolymph were possible at 0, 1 hr, 2 hrs following injections to "German" bees. After that, no more haemolymph could be punctured without damage which would adversely affect the physiological meaning of results. "French" bees were punctured only once, and one specific batch of animals was used for each time after injections and each dose. Samples from individual bees were collected and added the same volume of an ice-cold mixture of ethanol and pyridine (4 : 1; v/v), then centrifuged for 5 min at 3 000 × g for pelletting proteins and other macromolecules. The supernatants were directly used for thin layer chromatography (TLC : French Laboratory) or added 10 mM methyl-α-D-glucopyranosid (Fluka, CH-Buchs) as internal standard for gas chromatography studies (GC : German Laboratory). After short centrifugation the supernatant was given into derivative-vessels and dried in an dessiccator.

Analytical procedure in the German laboratory by gas chromatography (GC)

Carbohydrates from hemolymph were silylated by addition of 100 µl Sil-A (trimethychlorosilan, hexamethyldisilan and pyridin ; (1 : 3 : 9) ; Sigma Comp., Deisenhofen, Germany). The reaction time was 2 hours at room temperature ; 2 µl of the derivatives were injected

into the gaschromatograph (Vega 6000, Carlo Erba Comp., Milano, Italy). Separation of carbohydrates was achieved using a prepacked column SE 30 on Chromosorb WAW 80 — 100 mesh (Chromopack Comp., Müllheim, Germany) using a temperature program. Carbohydrates were detected by FID and concentrations integrated by Mega Sp 2490 (Carlo Erba Comp., Milano, Italy) using the relative amount of the peak area to the internal standard (9).

Analytical procedure in the French laboratory by thin layer chromatography (TLC)

Crude hemolymph was pretreated as described above. High performance TLC quantitative methods were used for carbohydrate determinations (11, 12). The sensitivity of carbohydrate detection using the reagent of BOUNIAS (13) allowed accucate determinations of the glycemia from the equivalent of 0.2 µl of hemolymph.

Statistical methods

Means were compared using the "t"-test. Correlation coefficients are designated by ρ and the regression slopes (d) were calculated using the least rectangle method for 2 aleatory variables. The standard deviation of slopes was given by the relation :

$$SD = \pm \sqrt{[(d/\rho)^2 - d^2]/(N-2)}.$$

N = number of pairs of data.

RESULTS

Action of vertebrate glucagon (French laboratory)

Only trehalose and glucose were present in emerging bees. Although all workers were daughters from the same queen, there remains some fluctuations in the variability between the bees taken from various combs. For this reason, all samples used for studying the effects of a same dose injected at different times after injection were chosen from the same side of one comb. Relative units were thus used for comparisons, in order to quentch the variability between different combs.

The average initial values and their standard deviations determined at time zero for not injected bees, were calculated for the whole series, including saline batches (dose zero) and the five other batches corresponding to the various doses of glucagon. Using the mean initial values of each series , the results were the following (n = 6) : Glucose = 5.39 ± 2.45 mM ; Trehalose = 17.0 ± 5.90 mM. *Table I* gives the variations of carbohydrates concentrations from 10 mn to 3 hours after injections. Significant increases are observed mainly with 50 and 100 ng glucagon injected per bee, and more

TABLE I. — *(French laboratory)* Action of porcine glucagon after in vivo injection of different concentrations into single honeybees. Means ± SD are given in relative units (see text) for 4 determinations

Time after injection (min)	*Dosis per animal (ng)*					
	0	10	50	100	400	500
Trehalose :						
0	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.60	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.30
10	1.01 ± 0.16	1.30 ± 0.17	1.75 ± 0.41	1.30 ± 0.23	1.11 ± 0.11	0.48 ± 0.06$^{b}_{d}$
30	1.18 ± 0.24	1.15 ± 0.13	1.85 ± 0.57	2.04 ± 0.21$^{a}_{c}$	1.12 ± 0.04	0.67 ± 0.26
60	0.87 ± 0.08	0.92 ± 0.26	2.61 ± 0.41$^{a}_{c}$	1.13 ± 0.13		0.77 ± 0.20
90	0.79 ± 0.08	1.29 ± 0.10	1.58 ± 0.48	1.04 ± 0.19	0.79 ± 0.17	0.35 ± 0.09$^{b}_{d}$
120	0.75 ± 0.42	0.20 ± 0.07	0.84 ± 0.39	0.90 ± 0.13	1.49 ± 0.27^{a}	1.24 ± 0.20
180	0.90 ± 0.08	0.62 ± 0.05	1.00 ± 0.27	0.54 ± 0.10	0.68 ± 0.08	0.53 ± 0.34
Glucose :						
0	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.31
10	1.29 ± 0.11	1.35 ± 0.21	3.82 ± 1.25$^{a}_{c}$	2.76 ± 0.20$^{a}_{c}$	1.43 ± 0.57	0.65 ± 0.11
30	1.83 ± 0.74	0.76 ± 0.07	3.88 ± 1.02^{a}	2.59 ± 0.26^{a}	1.64 ± 0.25^{a}	0.53 ± 0.34
60	1.38 ± 0.08	1.78 ± 0.80	4.05 ± 1.31^{a}	1.96 ± 0.75		1.90 ± 0.82
90	0.65 ± 0.08	1.96 ± 0.14$^{a}_{c}$	3.99 ± 2.12$^{a}_{c}$	4.22 ± 0.69$^{a}_{c}$	1.13 ± 0.24	0.95 ± 0.18
120	1.64 ± 0.33	0.48 ± 0.10	4.67 ± 1.50$^{a}_{c}$	2.80 ± 0.28$^{a}_{c}$	1.70 ± 0.16^{a}	1.08 ± 0.92
180	1.33 ± 0.22	1.03 ± 0.09	2.87 ± 0.86	1.88 ± 0.33	1.39 ± 0.25	1.75 ± 0.34

Comparison from time zero at each dose ($P < 0.05$) :
(^{a}) significant increase. (^{b}) significant decrease.
Comparison from dose zero at each time ($P < 0.05$) :
(^{c}) significant increase. (^{d}) significant decrease.

markedly for glucose than for trehalose. It is noteworthy that significant decreases of trehalose concentrations were also observed with the highest doses (500 ng per bee). Dose/effect relationships were plotted using the maximum values obtained *(Fig. 1)* shows that the maximum effect occurs at 50 ng per bee, and starts decreasing from 100 ng per bee considering dose 50 ng which gives the maximun response. A positive correlation can be observed between glucose and trehalose concentrations expreses in mM from zero to 60 min following injections *(Fig. 2)*. For N = 4 pairs of data, ϱ = 0.85 and d = 0.59 + 0.26. Then, from 60 min to 120 min the correlation becomes negative : ϱ = 0.77 and d = − 0.1 ± 0.08 *(Fig. 3)*. Fig. 1 illustrates the variations of the major carbohydrate components of worker honeybees hemolymph following the injection of endogenous (species specific ?) glucagon. It was not possible in Germany to obtain at once as numerous emerging bees as in the South of France, so that it was necessary to use previously emerged adult workers. In order to reduce the natural heterogeneity of bees, the initial batch of 200 adult bees was thus kept for 2 days at standard conditions described in "methods". A significant increase of both glucose and fructose concentrations is observed after one hour and two hours. By contrast, a significant decrease of trehalose levels is observed after one hour, i.e. when the release of either glucose and fructose is maximal.

The variations of total hemolymph carbohydrates are not significant, although a slight decrease at 1 hour was followed by a slight increase at 2 hours.

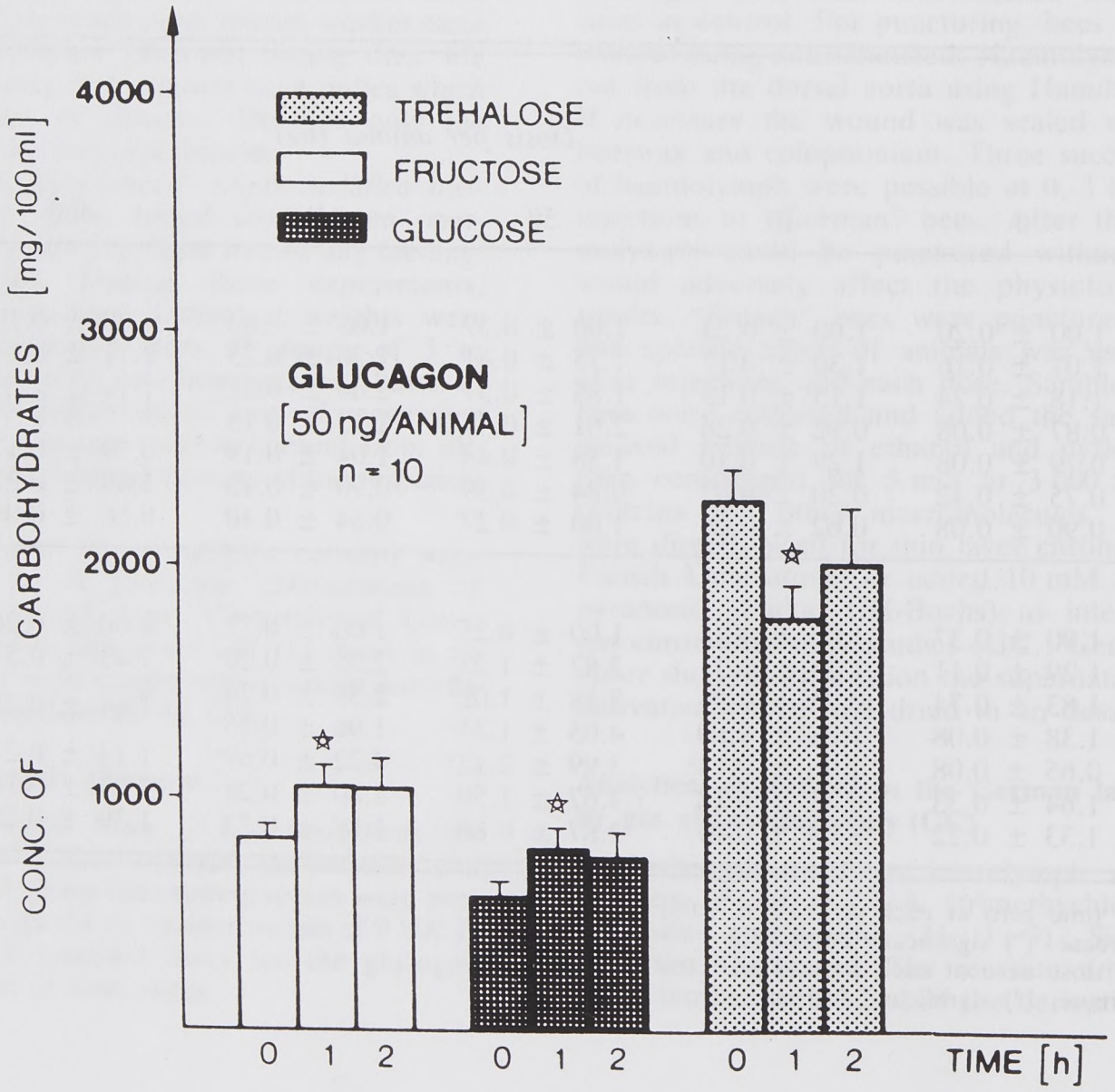


FIG. 1. — *Concentrations of carbohydrates in the hemolymph. To each animal 50 ng glucagon-like material of the bee (estimated by radioimmunoassay) was applied. After 1 and 2 hours 1 µl of hemolymph was yielded (for details : see methods) and determined by gaschromatography after silylation (☆ : significance at $p < 0.05$ after 1 hr).*

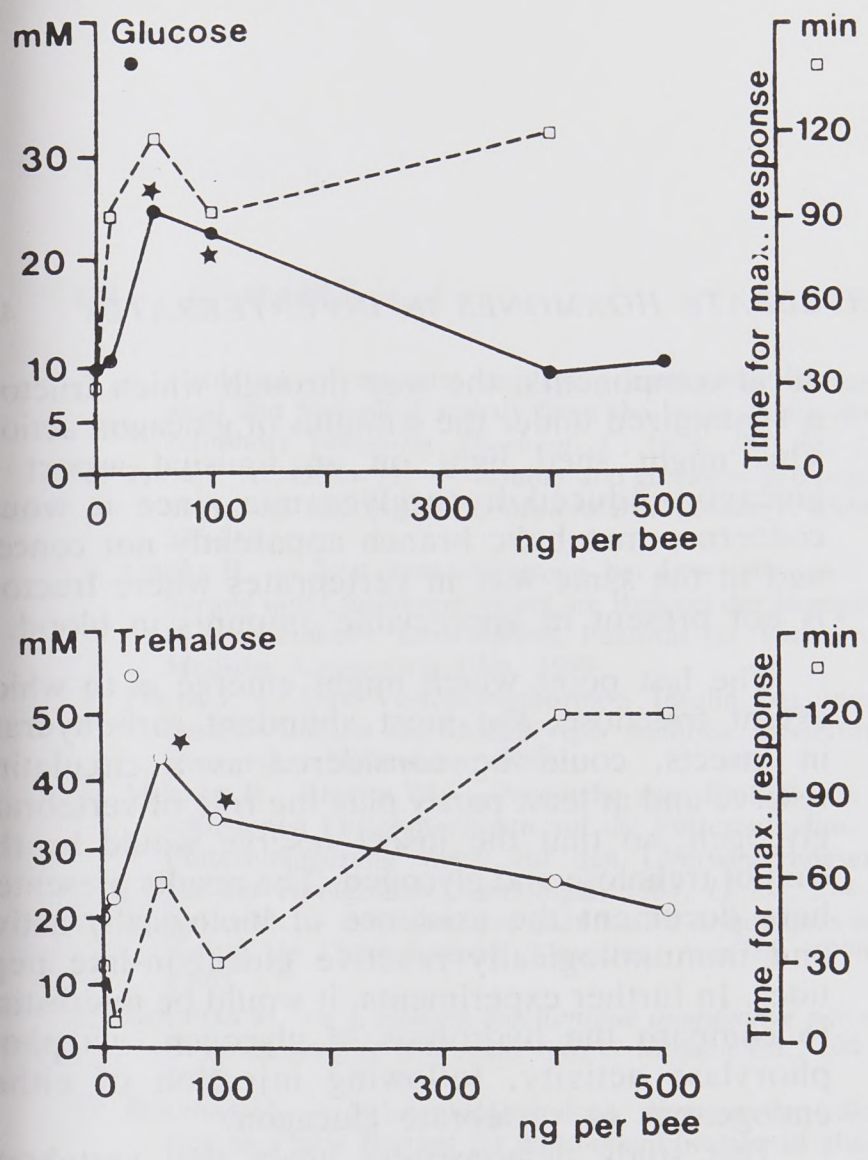


FIG. 2. — *Maximum responses of hemolymph trehalose (-o-) and glucose (-●-) and time at which they occur (-□-) as related to injected doses of vertebrate glucagon.*
(: significance at $P < 0.05$).*

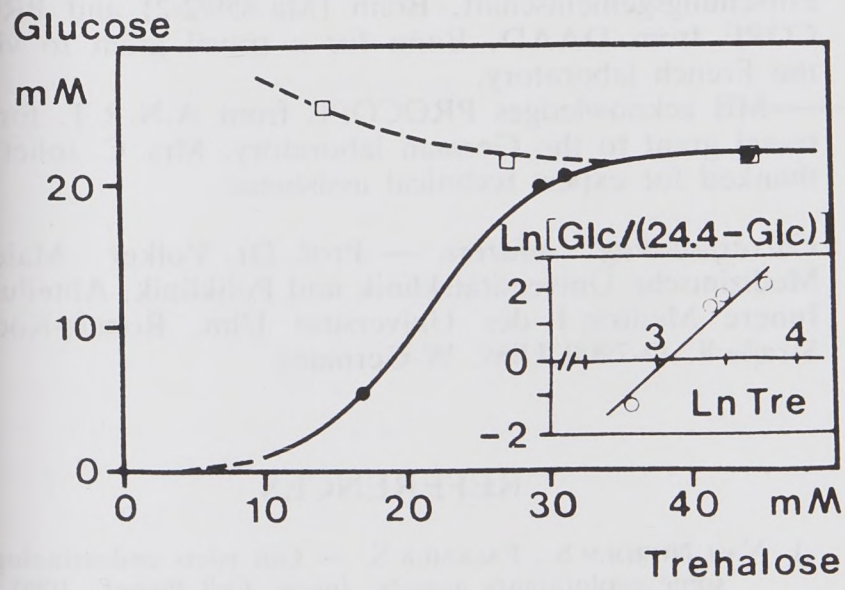


FIG. 3. — *Correlations between honeybees hemolymph glucose and trehalose concentrations following injection of 50 ng per bee of vertebrate glucagon. Natural units (mM) from 0 to 60 min (-●-) and from 60 to 120 min (-□-). Bilogarithmic HILL-plot from 0 to 60 min (-o-).*

DISCUSSION

Carbohydrate metabolism in insects appears to be highly complex since not only glucose but in addition fructose and especially high amounts of trehalose in large fluctuations are present in the hemolymph.

Red pigment-concentrating hormone (RPCH) from Crustaceans has been fully characterized by Fernlund and Josefsson (14). This RPCH-like activity has also been found in extracts of neurocrine organs of several insect orders. Hyperglycaemic activity supports the hypothesis that such peptides may be commonly uses as hormones in holometabolic insects.

Experimental approaches implicating the corpus cardiacum and other components of the neurosecretory system in the storage and secretion of this hormone include ablation of the endocrine tissue by surgery (15, 16), stimulation of the tissue electrically or mechanically (15, 16) and injection of tissue extracts into test animals (17, 18 , 19, 20, 21). Typically, injections of gland extracts result not only in hyperglycaemia, but also in depression of the glycogen content of the fat-body (22, 23), indicating the profound similarity of the action of this factor in insects to that of glucagon in vertebrates.

TAGER *et al.* (4) and Kramer (2) clearly showed the presence of glucagon-like peptides in insect hemolymph. The group of PFEIFFER detected insulin-like activity in Helix pomatia (24) and Apis mellifica (25). The presence of glucagon receptors in honeybees was suggested by preliminary experiments after injection of vertebrate glucaton to worker bees (26). In the present study exogenous porcine glucagon and the same concentrations of a purified bee hormone, estimated by radioimmunoassay, were injected into single bee and both preparations showed biological activity as in vertebrates.

The response of the honeybee glycaemia to vertebrate glucagon exhibited a particular feature in that it was apparently inhibited by hormone excess rather than reaching a saturation level. Such a mecanism might be consistent with the molecular model of biphasic regulation recently proposed in ligand/receptor interactions (27). Maximum increases are observed in a much longer time for glucose than for trehalose at low doses. This is in agreement with the hypothesis of splitting of glycogen as in vertebrates under glucagon action. As a result trehalose is produced from glucose-P and released as a primary product into haemolymph. Further conversion into glucose would simply occur under the action of haemolymph trehalases.

By contrast, the injection of endogenous glucagon results in a significant decrease of trehalose at one hour.

In the same time, both glucose and fructose are significantly increased. This last result is consistent

with a conversion of glucose, split from glycogen, into fructose, in fat body, prior to release in haemolymph. But in addition, the fact that the maximun increase of glucose is observed in the same time as the decrease of trehalose suggests the possibility of direct or indirect stimulation of trehalase activity by the injection of endogenous glucagon.

Several points favour the hypothesis that the hydrolysis of trehalose into glucose (a normal phenomen on subject to regular turnover) might be enhanced following glucagon injection. In the case of endogenous glucagon *(Fig. 1)*, the release of glucose and fructose occurs in the same time as a decrease in trehalose levels. Then, after injections of vertebrate glucagon, the levels of glucose, as a product of trehalase activity, are correlated to the concentrations of trehalose as the substrate. The shape of the relation suggests a HILL-type equation, whose parameters have been determined. Using the upper three points in the HILL plot, i.e. |Tre|vs|Tre/Glc|, an apparent maximum concentration of glucose can be obtained from the slope : d = 24.4 ± 0.1 mM (correlation : ϱ = 0.999). Then, the logarithmic form of the HILL equation can be written as : Ln|Glc/(24.4-Glc)| = n (Tre) − n Ln K, where n is the HILL coefficient and K a constant. Plotting the corresponding data *(Fig. 3)* give a higher correlation than in natural coodinates (ϱ = 0.944) with n = 3.70 and K = 21.8 mM. This is consistent with an expected increase of the velocity following a continuous increase of substrate concentrations, and consistent with the positive cooperativity previously evidenced for trehalase activity in honeybees. By contrast, from 60 to 120 min, glucose is apparently produced at the expense of trehalose suggesting that at the end of the hypertrehalosemic effect elicited by the hormone, the continuation of glucose increase could be due to the splitting of the remaining excess of trehalose. Lastly, from 120 to 180 min, since trehalose has recovered its normal levels, glucose is no longer provided by this way and turns back itself towards normal levels.

The species specific hormone showed the hyperglycaemic activity on especially glucose and fructose levels whereas porcine glucagon elevated trehalose levels too. Interestingly, the less specific action of porcine glucagon is, by contrast, of higher intensity than the action of endogenous peptide. On the other hand, the latter case could be experimented only on more aged bees where the hyperglycaemic response was distributed to glucose and fructose, whereas fructose is not yet present in emerging workers. Obviously, the synthesis of fructose, which apparently occurs in bees able to make honey, is as much under peptidergic control as the release of glucose. These observations first raise the question of the possible determinants of honeybees behavorial functions, in the hives, by their biochemical components, the way through which fructose is synthetized under the stimulus of glucagon action. This might shed light on an unusual aspect of glucagon-induced hyperglycaemia since it would concern a metabolic branch apparently not concerned in the same way in vertebrates where fructose is not present in appreciable amounts in blood.

The last point which might emerge is to which extent trehalose, the most abundant carbohydrate in insects, could be considered as a circulating reserve and at least partly play the role of vertebrate glycogen, so that the insect reserve would be the sum of trehalose and glycogen. The results presented here document the existence of biologically active and immunologically reactive glucagon-like peptides. In further experiments, it would be interesting to compare the hydrolysis of glycogen, via phosphorylase activity, following injection of either endogenous or vertebrate glucagon.

This study demonstrates again that vertebrate hormones and their respective structures in invertebrates are working indeed as hormones regulating cabohydrate metabolism. However, the mechanisms by which these peptides regulate sugar homeostasis are under current investigations.

Acknowledgement. — We thank Miss. S. Bertleff and Mrs. I. Repple for assistance in developing the glucagon assay and Dr. Herlitzius for supplying us with honeybees.

VM acknowledges financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn (Ma 859/2-2) and PROCOPE from DAAD, Bonn for a travel grant to visit the French laboratory.

MB acknowledges PROCOPE from A.N.R.T. for a travel grant to the German laboratory. Mrs. C. Joliet is thanked for expert technical assistance.

Corresponding address. — Prof. Dr. Volker Maier, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Innere Medizin I der Universität Ulm, Robert-Koch-Straße 8, D-7900 Ulm, W-Germany.

REFERENCES

1. Van Norden S., Falkmer S. — Gut islets endocrinology-some evolutionary aspects. *Invest. Cell Pathol.*, 1980, *3*, 21-35.
2. Kramer K.J. — Insulin-like and glucagon-like hormones in insects in : Neurohormonal techniques in insects. ed. T.A. Miller. Springer-Verlag, Heidelberg, 117-136, 1980.
3. Normann T.C., Vejbjerg K. — Secretion of hyperglycaemic hormone from the corpus cardiacum of flying blowflies, calliphora erythrocephela. *J. Insect Physiol.*, 1974, *20*, 1189-1192.
4. Tager H.S., Markese J., Kramer K.J., Speirs R.D., Childs C.N. — Glucagon-like and insulin-like hormones of the insect neurosecretory system. *Biochem. J.*, 1976, *156*, 515-520.
5. De Duve H., Thorpe A. — Immunofluorescent localisation of insulin-like material in the median neurosecretory cells of the blowfly, calliphora vomitoria (Diptera). *Cell Tissue Res.*, 1979, *2000*, 187-191.
6. De Duve H., Thorpe A., Neville R., Lazarus N.R. —

Isolation of material displaying insulin-like immunological and biological activity from the brain of the blowfly calliphora vomitoria. *Biochem. J.*, 1979, *184*, 221-227.

7. THORPE A., DUVE H. — Insulin- and glucagon-like peptides in insects and molluscs. *Molecular Physiology*, 1984, *5*, 235-260.
8. OBERT B. — Vertebratenhormone bei Invertebraten : Isolierung und Charakterisierung am Beispiel der Honigbiene (Apis mellifica). Dissertation, Fakultät für Theoretische Medizin, Universität Ulm, 1989.
9. FUCHS J. — Das Vertebratenhormon Insulin bei Invertebraten. Studien am Modell Apis mellifica. Dissertation, Universität Hohenhein, 1988.
10. MULLER B., RITTER W. — Versuche zum Einfluß von verschiedenen Futterangeboten auf die Futteraufnahme und Futtereinlagerung sowie auf den Überwinterungserfolg bei der Honigbiene. Apidologie, 1984, *15 (3)*, 274-276.
11. BOUNIAS M. — Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. *Analysis*, 1976, *4*, 87-93.
12. BOUNIAS M. — *L'analyse biochimique quantitative par nano chromatographie en couche mince.* Masson Ed., 204 pp., 1983.
13. BOUNIAS M. — N(l-naphtyl)ethylene diammonium dichloride as a new reagent for nano-quantification of glucides on T-L. plates by a mathematical calibration process. *Anal. Biochem.*, 1980, *106*, 291-295.
14. FERNLUND P., JOSEFSSON L. — Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis. *Science*, 1972, *177*, 173-175.
15. NORMANN T.C., DUVE H. — Experimentally induced release of a neurohormone influencing hemolymph trehalose level in calliphora erthrocephala (Diptera). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1969, *12*, 449-459.
16. VEJBJERG K., NORMANN T.C. — Secretion of hyperglycaemic hormone from the corpus cardiacum of flying blowflies, calliphora erythrocephala. *J. Insect. Physiol.*, 1974, *20*, 1189-1192.
17. STEELE J.E. — The site of action of insect hyperglycaemic hormone. *Gen. Comp. Endocr.*, 1963, *3*, 46-52.
18. BROWN B.E. — Pharmacologically active constituents of the cockroach corpus cardiacum : resolution and some characteristics. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1965, *5*, 387-401.
19. KEELEY L.L., FRIEDMAN S. — Corpus cardiacum as a metabolic regulator in Blaberas discoidalis. 1. Long term effects of carditecomy in whole body and tissue respiration and in trophic metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1967, *8*, 129-134.
20. MORDUE W., GOLDSWORTHY G.J. — The physiological effects of corpus cardiacum extracts in locusts. *Gen. Comp. Endocr.*, 1969, *12*, 360-369.
21. GOLDSWORTHY G.J., MORDUE W. — Neurosecretory hormones in insects. *J. Endocr.*, 1974, *60*, 529-558.
22. GOLDSWORTHY G.J. — The action of hyperglycaemic factor from the corpus cardiacum of Locusta migratoria on glycogen phosphorylase. *Gen. Comp. Endocr.*, 1970, *14*, 78-85.
23. WIENS A.W., GILBERT L.J. — Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in Leucophaea maderae. *J. Insect. Physiol.*, 1967, *13*, 779-794.
24. AMMON J., MELANI F., GRÖSCHEL-STEWART U. — Insulinaktivität bei Schnecken (Helix promotia L.) In : Die Pathogenese des Diabetes mellitus. Die endokrine Regulation des Fettstoffwechsels. *2. Tagung Dtsch. Diab. Ges.*, Wiesbaden, 1966.
25. MAIER V., STEINER P., FUCHS J., PFEIFLE B., MEZGER M., PFEIFFER E.F. — Isolation and partial characterisation of insulin of the honeybee (Apis mellifica). *Horm. Metab. Res.*, 1988, *20*, 421-425.
26. BOUNIAS M., PACHECO H. — Sensibilité de l'abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. *C.R. Acad. Sc.*, 1979, *289D*, 201-204.
27. BOUNIAS M. — Biphasic regulation in ligand/receptor interactions. *J. Enzyme Inhibition*, in press, 1989.

© *Masson, Paris, 1990*

Biol. Chem. Hoppe-Seyler
Vol. 371, pp. 771–828, September 1990

4th Joint Meeting

Société de Chimie Biologique
Schweizerische Gesellschaft für Biochemie
Gesellschaft für Biologische Chemie

September 17th–19th, 1990 in Konstanz

Abstracts (in alphabetical order of first authors)

M.A.M. Abou-Seif, M. Mezger, K. Gietzen*, V. Maier, M. Bounias** and E.F. Pfeiffer

Melittin decreases carbohydrate content in the haemolymph of honeybee (Apis mellifica)

Carbohydrate metabolism in insects is completely different from invertebrates. Trehalose, the non-reducing disaccharide, is the predominant form of circulating carbohydrates in insect-haemolymph, although smaller amounts of glucose, fructose and sucrose also occur.
Melittin, a constituent of the poison of the honeybee, has identical amino acids at positions 1, 2, 13 and 16 resp. in addition at 10 and 18 in some species as compared with the A-chain of the insulin molecule. Antibodies raised against insulin recognize melittin (1).
Exogenously administered porcine insulin is able to lower haemolymph sugars. Therefore the influence of melittin was tested.

1 µl melittin (100 ng/µl; 33 pMol/insect; highly purified by HPLC, phospholipase free)) was injected through tergum III of the honeybee. At 0, 45 and 90 min., 1 µl of haemolymph was drawn. The haemolymph carbohydrate concentrations were measured by gas chromatography after silylation. Similar to insulin injection (2) melittin is able to decrease the three haemolymph sugars trehalose, glucose and fructose by ca. 34 %.

The basic nutrients of bees are carbohydrates and proteins. The carbohydrate spectrum of the honeybee is not constant and depends on the food composition. Metabolic control is not clear.

We found that the administration of melittin decreases the carbohydrate concentrations in the haemolymph of honeybees similar to insulin. It is yet unknown if these observations are part of normal regulation in the honeybee metabolism using a highly conserved molecule during evolution .

1) Obert, B. (1989) Diss. Dr. rer biol. hum., Universität Ulm.
2) Bounias, M. and Pacheco, H. (1979) C. R. Acad. Sc. Paris 289, 201-204.

V. Maier, M.A.M. Abou-Seif, M. Mezger, E. F. Pfeiffer, Abteilung Innere Medizin I, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Robert-Koch-Str. 8, D-7900 Ulm.

K. Gietzen*, Abteilung Pharmakologie und Tokikologie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-7900 Ulm.

M. Bounias**, Laboratory of Biochemistry, University of Avignon & INRA, B.P. 91, F-84140 Montfavet, France.

A. Ackermann, L. Lerch, G. Henning, U. Wiegmann, R. E. Gerhards

Investigation in cellular localization of a group of new transformation-associated embryonic antigens (TAEA)

The transformation of human cells is often combined with alterations at the cell surface. The new appearance or overexpression of cell surface proteins seems to be one step in the complex process of carcinogenesis, e.g. the oncogene products erb-B and fms, which are truncated growth factor receptors.
The aim of our study was to characterize a set of eight transformation-associated embryonic antigens (TAEA) which could be found in many transformed cell lines from various species[1].
After immunoprecipitation with defined antisera they could be detected as p105, p86, p74, p68, p46, p42, p40 and p35. Five of these TAEA proteins could be determined as membrane-associated polypeptides by enrichment with nonionic detergent Triton X114.
In order to reveal the cellular localization of the antigens we made investigations by immunofluorescence technique with polyclonal and monoclonal antibodies. We examined cryo sections of human tumor tissue and appertaining tumor cell lines in early passages, predominantly of the gastro intestinal tract.
Thereby we could verify membrane association and could show secretion of some TAEA.

1) Gerhards,R.E. and Mehnert,F.E. (1986) J.Cell.Biochem. 31, 27-39.

Copyright © by Walter de Gruyter & Co · Berlin · New York

DETERMINISMES CHRONOBIOLOGIQUES DE LA GLYCÉMIE ET DE LA LIPÉMIE DE L'ABEILLE

1° La Glycémie

Coll. avec le Dépt. de Zoologie INRA
et avec l'Institut Hassan II de Recherches
Agronomiques et Vétérinaires de Rabat (Maroc)

Chronobiologia, 17, 201-206.

2° La Lipémie

Collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire de Bratislava, Tchecoslovaquie.

(Prof.r Dr. M. Mikulecky)

reprint from

CHRONOBIOLOGIA

Vol. XVII - July-September 1990 - Number 3

LUNAR PHASE INFLUENCE ON THE GLYCEMIA OF WORKER HONEYBEES

EL HASSANIA MOHSSINE *, MICHEL BOUNIAS **, JEAN-MARIE CORNUET ***

*Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Agdal, Rabat, Maroc **

*Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, Montfavet Cédex, France ***

*Station de Zoologie, INRA-AVIGNON, Montfavet Cédex, France ****

As early as 1936, WILLIAMS[21] drew the attention to the possible influence of the moon phase on the activity of noctuid moths, although further experiments left some doubt about the nature of this phenomenon[22]. In fact, evidence was then given that moon light was the essential factor inhibiting the activity of insects[10, 13, 17, 18]. In addition, other experiments suggested that temperature might be a more important factor than the lunar periodicity, in controlling the activity of nocturnal moths[11]. More intriguing was the appearance of the data of OCHMKE[13] showing an influence of the lunar periodicity on the flight activity of a diurnal insect: the honeybee. In previous experiments[3] large variations were observed in the glycemia of emerging workerbees of the same hive, and we finally decided to examine further series of determinations in correlation with the lunar cycle.

MATERIALS AND METHODS

Emerging worker honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.) were gathered from still operculated alveoli. Their haemolymph was collected daily by puncturing the dorsal aorta with 50 µl Hamilton microsyringes. An average 25 µl was obtained for each bee, and immediately added to the same volume of an ethanol-pyridine (4/2, v/v) mixture, then centrifuged for 20 min at 5,000 *g*. The supernatant was used for carbohydrate determinations according to previously described chromatographic techniques[4, 7]. Duplicate determinations were performed from 0.4 µl of supernatant for each sample. For each determination, the haemolymph of 6 bees was collected and pooled; the whole operation lasted less than one hour and was conducted under refrigeration at about 2-4 °C. Each day, a new group of emerging bees was trapped from another comb, for successive analysis. A first set of experiments was conducted from April to June from a single

---

Key-words: Circaseptan subcycle; Glucosemia; Honeybees; Moon-phase cycel; Trehalosemia.

Received September 11, 1989.

Chronobiologia *17*, 201-207, 1990.

days from full moon phase	date	Tre	Glc
3	22/4	38.15 ± 2.05	2.75 ± 0.49
10	29/4	34.95 ± 1.34	2.95 ± 0.07
1	5/5	35.8 ± 2.69	3.27 ± 0.18
9	13/5	14.9 ± 0.57	2.3 ± 0.57
1	20/5	29.17 ± 4.49	3.45 ± 0.42
2	21/5	36.12 ± 0.03	5.87 ± 0.11
7	26/5	17.87 ± 0.45	5.65 ± 0.07
8	27/5	13.75 ± 1.63	2.6 ± 0.71
14	16/6	39.47 ± 8.94	8.85 ± 1.06
0	17/6	36.70 ± 5.02	8.00 ± 0.07
1	18/6	40.10 ± 2.40	8.20 ± 0.42
6	23/6	9.47 ± 0.67	3.19 ± 0.42
7	24/6	28.28 ± 0.35	4.00 ± 0.42

Tab. 1 - Variations of trehalose (Tre) and glucose (Glc) concentrations (mM) according to lunar phases during the first part of the experiment.

hive and a second set from July to September from a series of 40 hives. The statistical treatment of data was adjusted to take account of the number of animals available which was higher in summer. The first series was simply treated by analysis of variance, using the lunar phase as a controlled factor. In the second series, the larger number of hives allowed us to use the repetitivity index (R) defined as the ratio of the inter-colony component of the variance (γ B) to the total phenotypic variance (γ B + γ E), from classical variance analysis with the glycemia used as controlled factor i.e. $R = \gamma B/(\gamma B + \gamma E)$. The glycemia was, hypothetically, assimilated to a periodic function of the sinusoidal type:

$$G_{jt} = G + G_j + a \sin [\omega (t + ø)] + E_{jt} \qquad [1]$$

in which G_{jt} is the glycemia of colony (j) at time t, G_j is the average effect of the glycemia of colony (j), ω is the angular speed, a the mean amplitude of oscillations and ø the phase shift expressed in days. The values of ø were allowed to vary from zero to 28 days, with the origin fixed at full moon.

In this case, R can also be defined, at successive times t and t', by the following expression:

$$R = \text{Cov}(G_{jt}, G_{jt'}) / \sqrt{\text{Var}(G_{jt}) \cdot \text{Var}(G_{jt'})} \qquad [2]$$

The confidence interval of R has also been fitted by BADIA and MASSON[1].

Correlation coefficients are designated by ρ and the probabilities associated to the various tests (= risk levels) are designated by p.

RESULTS

As usual, trehalose and glucose were found as the major components of the glycemia of emerging bees. Both were linked, as previously shown[3] by a significant positive correlation, namely:

$\rho_1 = 0.598$ ($p_1 = 0.0012$) in the first series, (N = 26) and
$\rho_2 = 0.631$ ($p_2 = 1, 3.10^{-5}$) in the second series, (N = 40)

Table 1 indicates the values obtained for the first series (April, May, June). These data have been averaged into a single representation of the variations

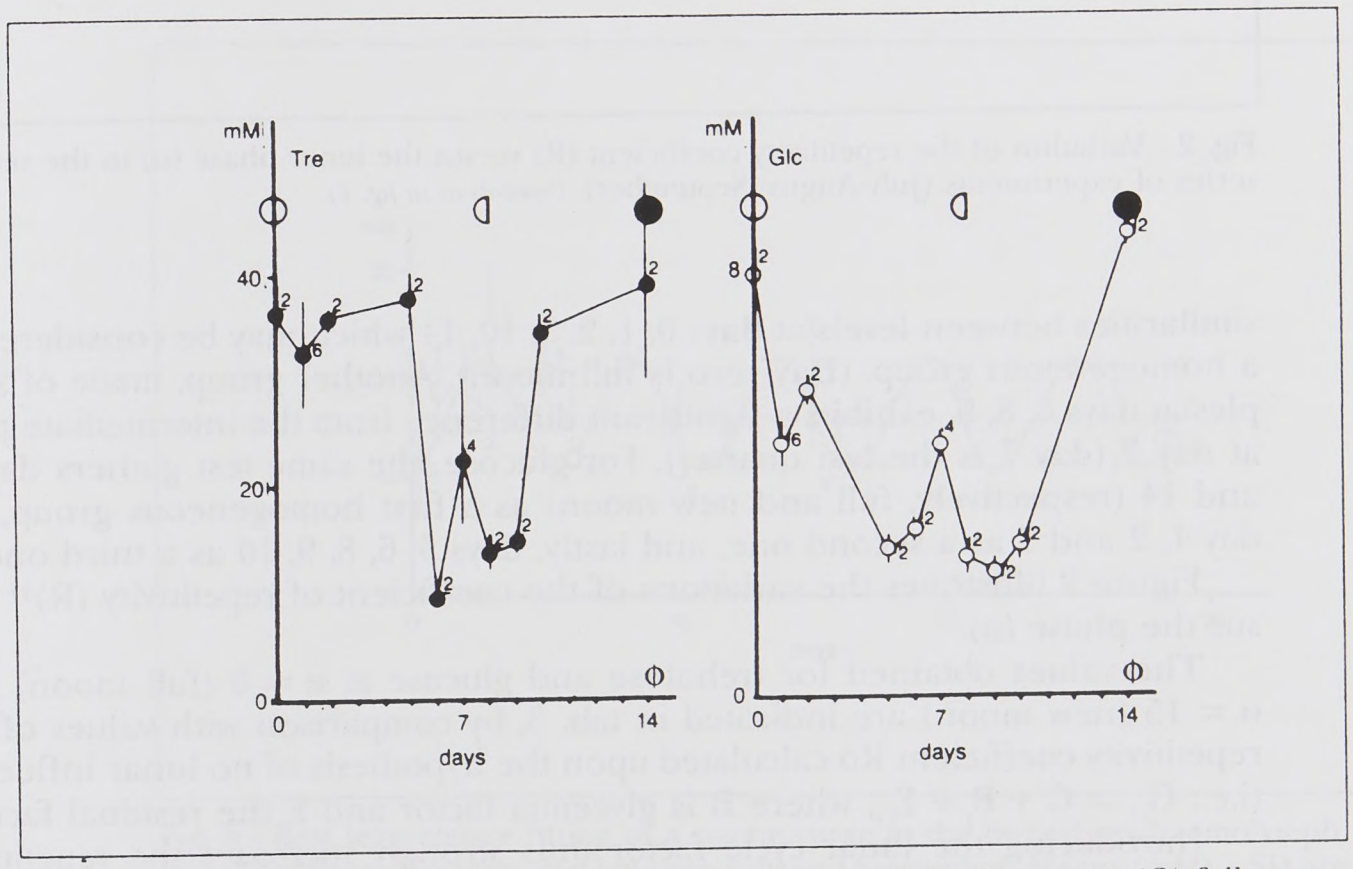


Fig. 1 - Average values of the glycemia (mM) at the characteristic phases (ø): (O) full moon; (◑) last quarter: (●) new moon *[Tre = trehalose; Glc = glucose; first series of experiments (April-May-June); means ± SD (vertical bars values) from 2 to 6 independent determinations].*

from full moon to new moon, as depicted in fig. 1. Following analysis of variance a significant effect of the 'lunar factor' phase was observed both for trehalose and glucose. The corresponding data are given in tab. 2. For trehalose, the Newman-Keuls test revealed, at the 5% confidence level, significant

	total variation	LC variation	residual variation
trehalose:			
SSD	2668.6	376.94	-
df	16	9	7
MS	23.55	296.51	4.85
F	-	12.58	-
p (F)	-	$p<0.01$	-
glucose:			
SSD	100.77	36.92	-
df	16	9	7
MS	2.31	11.19	1.52
F	-	4.85	-
p (F)	-	$p = 0.05$	-

Tab. 2 - Analysis of variance data for the effect of lunar cycle (LC) on haemolymph trehalose and glucose in emerging workerbees. *(SSD = sum of squares of deviations; d.f. = degrees of freedom; MS = mean squares).*

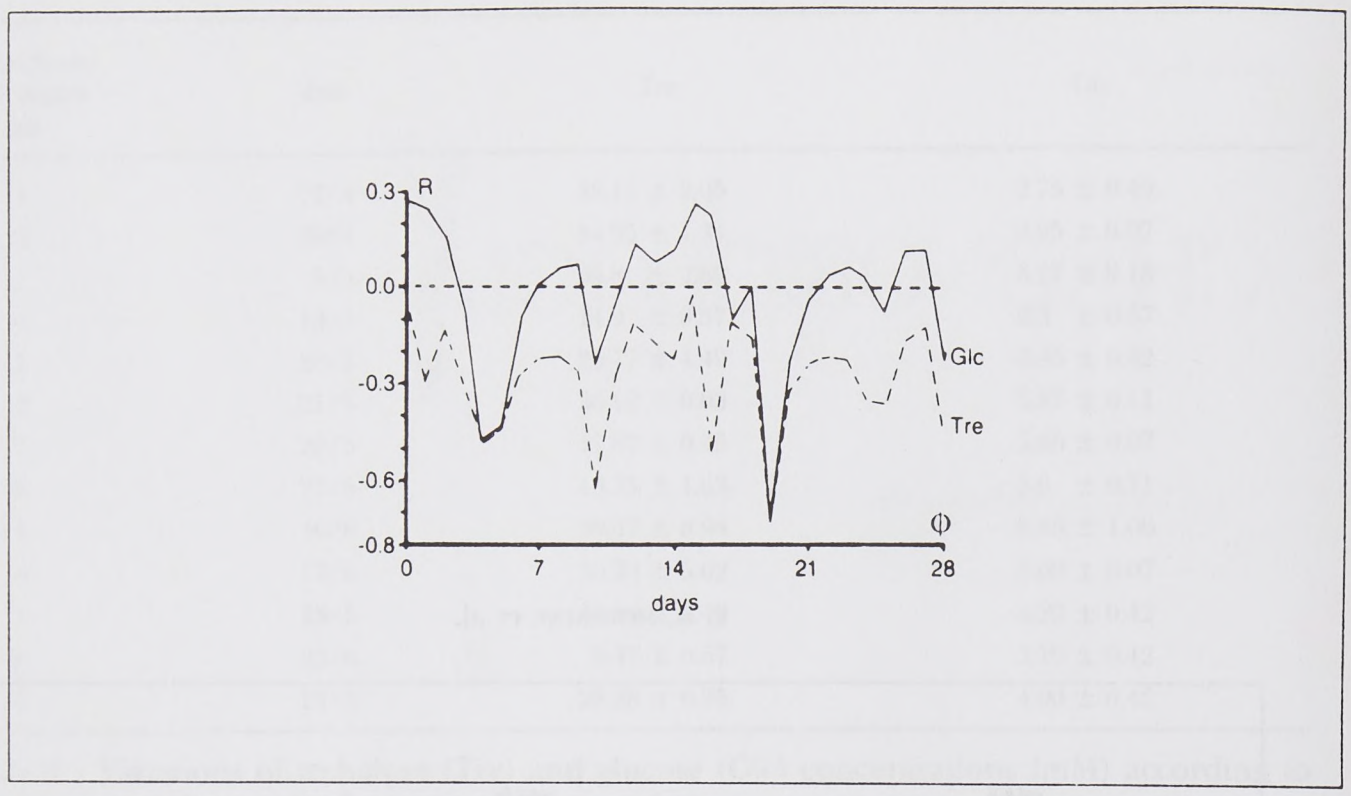


Fig. 2 - Variation of the repetitivity coefficient (R) versus the lunar phase (ø) in the second series of experiments (July-August-September). *(Symbols as in fig. 1).*

similarities between levels at days 0, 1, 2, 5, 10, 14 which may be considered as a homogeneous group. (Day zero is full moon). Another group, made of samples at days 6, 8, 9, exhibits a significant difference from the intermediate peak at day 7 (day 7 is the last quarter). For glucose, the same test gathers days 0 and 14 (respectively, full and new moon) as a first homogeneous group, the day 1, 2 and 7 as a second one, and lastly, days 5, 6, 8, 9, 10 as a third one.

Figure 2 illustrates the variations of the coefficient of repetitivity (R)[11] versus the phase (ø).

The values obtained for trehalose and glucose at ø = 0 (full moon) and ø = 15 (new moon) are indicated in tab. 3, by comparison with values of the repetitivity coefficient Ro calculated upon the hypothesis of no lunar influence (i.e.: $G_{jt} = G + B_j + E_{jt}$, where B is glycemia factor and E the residual factor).

Introducing the lunar cycle factor thus strongly increases the repetitivity coefficients for both trehalose and glucose with significance at p = 0.05.

	trehalose		glucose	
	ø = 0	ø = 15	ø = 0	ø = 15
B	- 0.3727	- 0.9756	0.3003	0.2956
E	37.1527	39.9324	0.8253	0.8496
R	- 0.1010	- 0.0250	+0.2668	0.2582
Ro	-0.150		+0.0627	

Tab. 3 - Inter colony variance (B), residual variance (E) and coefficients of repetitivity obtained for trehalose and glucose in the second series of experiments.

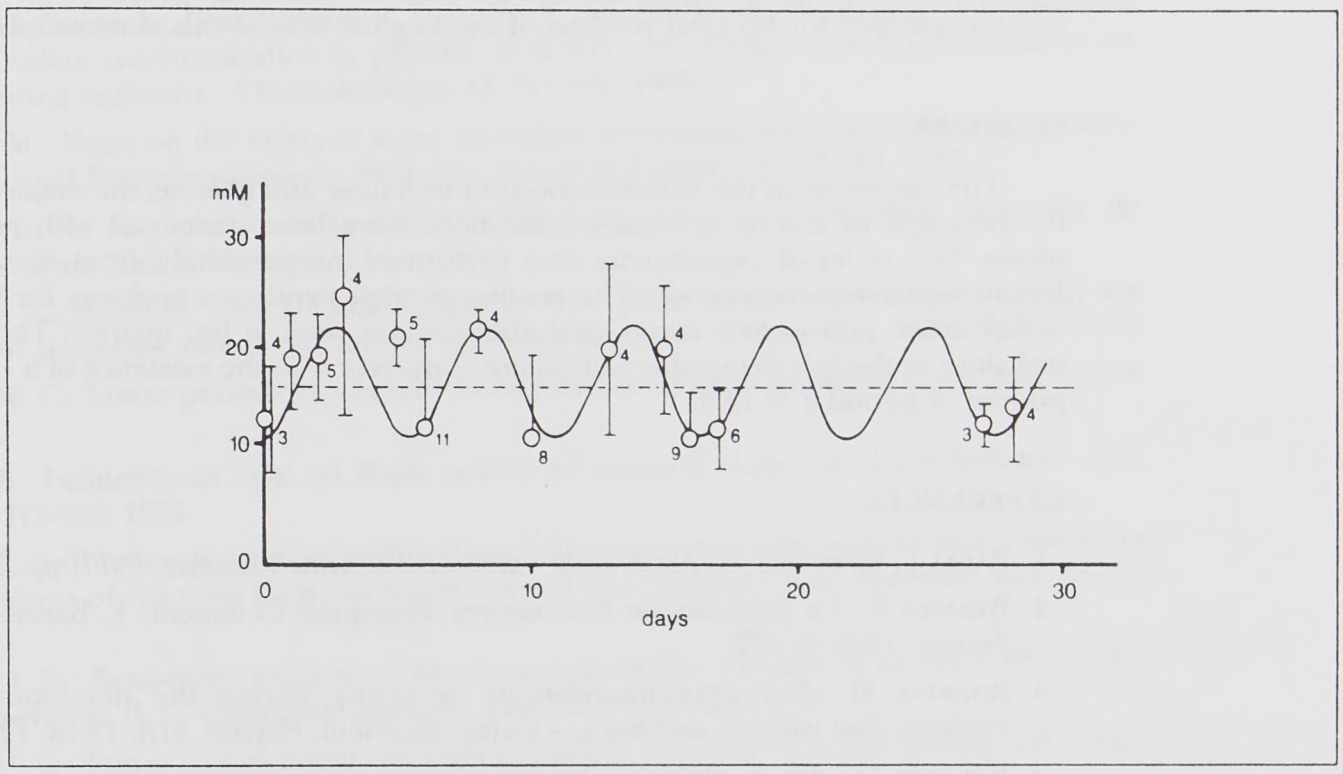


Fig. 3 - Best least-square fitting of a cosine curve to the honeybees-haemolymph trehalose concentrations as determined between July and September. Means (mM) ± SD are given for the number of replications given near each experimental point.

Looking at the results presented in figs 1 and 2 strongly suggests the possibility of a circaseptan subcycle with a period of approximately a week. Fitting the second set of data (the most numerous) to the maximum likelyhood curve using the least-square method allowed a significant conclusion ($p = 0.001$) to be reached with the following equation for trehalose variations:

$$G = 16.2+5.2 \sin (2\pi \frac{X}{5.52} + \frac{3\pi}{2})$$

i.e. MESOR: $M = 16.2$ mM: amplitude: $A = 5.2$ mM; period $\tau = 5.52 \pm 0.44$ days ($N = 7$), i.e. 132 ± 11h (fig. 3). Correlation parameters between experimental and theoretical data are: $\rho = 0.781$ ($N = 14$ pairs) and the slope $b = 1.00 \pm 0.23$ i.e. a quite satisfactory fitting to 1/5 of lunar period.

DISCUSSION

In emerging worker bees, the haemolymph concentrations of both trehalose and glucose exhibited a significant peaking at full moon and new moon. In addition, a significant minor peak was also discerned at last quarter. The existence of a circaseptan rhythm, with a period of 5-6 days was evidenced for the major carbohydrate component, and thus confirmed a similar component previously discovered by HAYES et al.[12]. As the honeybee is not a nocturnal insect, these results cannot be explained by influence of moonlight as was the case for lepidopteran and coleopteran[15], despite some contradictory reports[9].

In fact honeybee glycemia is under the control of hormonal factors, including biogenic amines[5], which themselves seem to act under the influence of the lunar cycle. In effect, ROUNDS[19, 20] has given evidence that the accelera-

tion of insects cardiac muscle by noradrenaline *in vitro* depends on the lunar phase, with important amplitude peakings at full moon and new moon, and minor intermediate peaks.

The mechanism of the latter effect remains to be elucidated, but it is likely that this might link with the observed hyperglycaemic peaks since noradrenaline acts as a hyperglycaemic agonist and also with flight activity[16], which involves the supply of glucose as fuel for energy.

Of course, this might be of importance in the pollinating activity of bees[2] and consequently on their honey production[8].

It will now be most interesting, in further experiments, to examine the influence of variations of gravitational and electromagnetic fields on the metabolism of the honeybee.

ACKNOWLEDGEMENTS

E. H. Mohssine was supported by a grant of the Moroccan government. Dr. M. R. J. Morgan is acknowledged for his kind revision of the English style of this manuscript.

SUMMARY

The variations of the concentrations of trehalose and glucose, the major components of the haemolymph of emerging worker honeybees, have been examined with respect to the lunar phase. Two series of experiments were performed independently, from April to June and from July to September respectively. The results revealed significant peakings for both carbohydrates at full moon and at new moon, and also a minor peak at last quarter. The data obtained for trehalose in the July-September period are consistent with the existence of a circaseptan subcomponent of period $\tau \simeq 132$h.

REFERENCES

1. Badia J., Masson J. P.: Analyse de variance. Ed. Inra-Toulouse, 1977; pp. 200.
2. Barbier E.: La pollinisation des cultures: Pourquoi? Comment? E. Barbier Editor, Le Pontet, France, 1986; p. 477.
3. Bounias M.: Intraglycemic relations occurring during the development of honeybees workers, *Apis mellifica mellifica* L. - Comp. biochem. Physiol. *61A*, 13-18, 1978.
4. Bounias M.: N(1-naphthyl) ethylene diammonium dichloride as a new reagent for nano quantification of glucids on thin layer plates by a mathematical calibration process - Analyt. Biochem. *106*, 291-295, 1980.
5. Bounias M.: Cinétiques d'action de la nor-adrénaline, de la dopa et de la dopamine sur la glycémie de l'abeille *in vivo* - Arch. int. Biochim. Physiol. (Liège) *88*, 93-98, 1980.
6. Bounias M.: Blood sugar levels in worker honeybees of different races as an index of their honey production - J. Apic. Res. *20*, 215-220, 1981.
7. Bounias M.: L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson Editeur, 1983; pp. 205.
8. Bounias M., Morgan M. R. J.: The yearly honey productivity of hives as correlated to the glycemia of emerging worker bees - India. J. agric. Chem. *19*, 155-160, 1986.
9. Brown E. S., Taylor L. R.: Lunar cycles in the distribution and abundance of airborne insects in the Equatorial Highlands of East Africa - J. anim. Ecol. *40*, 767-779, 1971.
10. Hanna H. M., Atries I. E.: The effect of moonlight on certain nocturnal lepidoptera - Bull. Soc. Entomol. Egypte *53*, 7-12, 1969.
11. Hardwick D. F.: The influence of temperature and moon phase on the activity of noctuid moths - Canad. Entomol. *104*, 1767-1770, 1972.

12. HAYES D. H., SHADE L., CORNÉLISSEN G., HALBERG E., MILLER R. W., HALBERG F.: Chronomodulatory infradian synchronization by placebo or ACTH 1-17 of *Musca autumnalis* mortality on shifted lighting regimens - Chronobiologia *12*, 361-365, 1985.

13. HOSNY M. M.: Notes on the effect of some secondary environmental conditions on the activity of nocturnal Macrolepidoptera - Bull. Soc. Entomol. Egypte *39*, 297-314, 1955.

14. MOHSSINE E. H.: Héritabilité de la glycémie dans une population d'abeilles - Mémoire de DEA, Univ. Paris-Sud, 1985; pp. 57.

15. NOWINSZKY L., SZABO S., TOTH G., EKK I., KISS M.: The effect of the moon phases and of the intensity of polarized moonlight on the light-trap catches - Z. Ang. Ent. *88*, 337-353, 1979.

16. OCHMKE M. C.: Lunar periodicity of flight activity of honeybees - Interdisc. Cycle Res. *4*, 319-335, 1973.

17. PERSSON B.: Influence of light on flight activity of noctuids (Lep.) in South Sweden - Ent. scand. *2*, 215-232, 1971.

18. PERSSON B.: Influence of weather and nocturnal illumination on the activity and abundance of populations of noctuids (Lep.) in South Coastal Queensland - Bull. Entomol. Res. *66*, 33-63, 1976.

19. ROUNDS H. D.: Semi-lunar cyclicity of neurotransmitter-like substances in the CNS of *Periplaneta americana* (L.) - Comparat. biochem. Physiol. *69*, 293-299, 1981.

20. ROUNDS H. D.: Lunar and seasonal variation in cardiac response to acetylcholine and noradrenaline - Comparat. biochem. Physiol. *74C*, 373-376, 1983.

21. WILLIAMS C. B.: The influence of moonlight on the activity of certain nocturnal insects, particularly of the family *Noctuidae* - Philos. Trans. roy. Soc. *226*, 357-389, 1936.

22. WILLIAMS C. B., SINGH B. P.: Effect of moonlight on insect activity - Nature (Paris) *4256*, 853, 1951.

Requests for reprints should be addressed to:

MICHEL BOUNIAS
Laboratoire de Biochimie
INRA-AVIGNON
B.P. 91, F84143 Montfavet Cédex
France

2°

ETUDE DE LA PÉRIODICITÉ DES VARIATIONS DE CONCENTRATIONS DES LIPIDES DE L'HÉMOLYMPHE D'ABEILLES

Les données numériques présentées dans le tableau ci-après, vont faire l'objet d'une étude statistique en collaboration avec le Prof. Dr. Mickulecky, Directeur du C.H.U. de Bratislava, en Tchécoslovaquie

Comme dans le cas de la glycémie, les corrélations avec les phases lunaires feront l'objet d'une attention toute particulière -

Chronobiologie :

Variations de la lipémie de l'abeille

conc. in nanomols per mg ± S.D. (N≥3)

Lunar phases Exp° Dates	Phospho lipids	Fatty acids	steroids	Diacyl 1-2 Glycerols	Diacyl 1-3 Glycerols	Triacyl Glycerols
19-4(O) 24-4=◐ 29-4	4.4 ± 0.9	0.10 ± 0.03	0.53 ± 0.13	0.21 ± 0.07	0.03 ± 0.00	0.053 ± 0.006
4-5=● 5-5	3.5 ± 0.1	0.26 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.30 ± 0.03	illegible	0.042 ± 0.002
6-5	illegible	0.22 ± 0.03	0.38 ± 0.04	illegible	illegible	0.037 ± 0.009
10-5=◐ 12-5	3.4 ± 0.5	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	illegible	illegible	0.008 ± ? 0.013 ± 0.01
13-5	3.8 ± 1.5	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.04	illegible	illegible	0.012 ± ...
11-5=○ 20-5	3.5 ± 0.4	0.05 ± 0.01	0.27 ± 0.0?	illegible	0.018 ± 0.006	0.031 ± 0.002
21-5	3.9 ± 0.2	0.2 ± ?	illegible	illegible	illegible	0.019 ± ...
◐ 26-5	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible
27-5	3.0 ± 0.7	illegible	0.06 ± 0.02	illegible	illegible	0.016 ± 0.007
2-6=● 16-6	illegible	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.03	illegible	0.07 ± 0.02	0.009 ±
○ 17-6	illegible	0.07 ± 0.01	illegible	illegible	illegible	0.025 ±
18-6	illegible	0.01 ± ?	0.07 ±	illegible	0.033 ± 0.003	Not determined
23-6	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible
24-6	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible	illegible
25-6=◐						
1-7=●						

C.R. Ann. LBC, 19, 1990

TOXICOLOGIE GÉNÉRALE

1°_ Théorie de la Létalité_

- C.R. Acad. Sc. 310 III, 65-70
- Extrait du Livre "La terre Malade des Hommes" (Ph. Desbrosses)

2°_ Interactions biphasiques

- C.R. Acad. Sc., 310 III, 1-6
  Collaboration avec l'Université d'Avignon_(Prof. Coulomb)

3°_ Lutte contre le Varroa Jacobsoni

- J. Apic. Res., 28, 201-207
- Thèse de Doctorat
- Synergie Cu^{++}/Amitraz_
  Collaboration avec la Pologne (DR. I. KRUK)
  Institut de Physique, SZCZECIN

} Collaboration avec l'Univ. de Belgrade : Prof. Popeskovic_

4°_ Action de la Toxine du Bacillus thuringiensis

Collaboration avec l'Université de Montpellier (Professeur C. P. Vivarès)_ C.R. Coll. Internat.

5°_ Traumatologie Biochimique Végétale

(Collaboration avec le CNES)

_ J. Sc. Expl., 4, 1-18_

1° a

45

C. R. Acad. Sci. Paris, t. 310, Série III, p. 65-70, 1990

Toxicologie/*Toxicology*

Définition algébrique de constantes toxicologiques caractéristiques de la létalité

Michel BOUNIAS

Résumé – L'équation de Hill : $m_i = M_{max}/(1+[T_i/t]^{ni})$ décrit la courbe de mortalité (m_i) d'un organisme vivant sain ou intoxiqué en fonction du temps (t). Les paramètres T_i et n_i sont eux-mêmes fonctions des doses (d_i) de toxiques selon la même équation. Les doses dT_{50} et dN_{50} entraînant une variation demi-maximale des paramètres T_i et n_i sont deux constantes toxicologiques fondamentales. Les vitesses de mortalité Δ_i (tangentes à la courbe de mortalité) obéissent également à une équation de même type permettant de définir une autre famille de constantes : $d\Delta_{50}$. La DL_{50} est, en revanche, variable de zéro à l'infini. Le modèle est directement généralisable aux phénomènes inverses entraînant une stimulation de la durée de vie des organismes.

Algebraic derivation of toxicologic constants characteristic of lethality

Abstract – *The Hill equation,* $m_i = M_{max}/(1+[T_i/t]^{ni})$, *describes the mortality* (m_i) *versus time* (t) *of a normal or an intoxicated organism. Parameters* T_i *and* n_i *are, in turn, functions of doses* (d_i) *of toxin, according to the same equation. Doses* dT_{50} *and* dN_{50} *eliciting a half-maximum variation of parameters* T_i *and* n_i *are both fundamental toxicological constants. The tangents* (Δ_i) *to the curve of mortality vs time also obey the same type of equation and allow an additional family of constants,* $d\Delta_{50}$, *to be derived. In contrast,* LD_{50} *varies between zero and infinite. The model can be readily generalized to the opposite phenomena involving a stimulation of the life span of organisms.*

Abridged English Version – The validity of the LD_{50} as a toxicological parameter has been questioned for several years ([1], [2]). Then, the probabilistic methods [3] do not allow the determination of the saturation limit of dose/mortality curves, and the importance of parameter time is not taken into consideration. We have recently emphasized the interest of the Hill equation as a suitable algebraic basis [4], and the present work develops the subsequent theory of lethality.

Mortalities (m %) of living organisms can first be expressed as a function of time (t) according to equation

$$m_i = M_{max}/(1+|T_i/t|^{ni}) \quad (1)$$

in which $M_{max} = 100\%$, T_i is time at which half the population survives, and n_i is the Hill coefficient (*Fig.*, A). In the presence of a toxic, T_i and n_i are functions of doses d_i according to the same basic equation

$$T_i = T_0 - (T_0 - \tau)/(1+|\alpha/d_i|^{NT}) \quad (2)$$

where τ is an asymptotic limit >0, T_0 for $d_0 = 0$, N_T a constant Hill coefficient and $\alpha = dT_{50}$ the dose decreasing $(T_0 - \tau)$ by half. Then:

$$n_i = n_0 + (n_{ex} - n_0)/(1+|\beta/d_i|^{Nn}) \quad (3)$$

where n_{ex} is an asymptotic extremum, n_0 at $d_0 = 0$, N_n a constant Hill coefficient, and $\beta = dN_{50}$ the dose giving half of the maximum variation of n_i, *i.e.* $(n_{ex} - n_0)/2$ (*Fig.*, B and C, respectively).

The tangent at time/mortalities curve at $m_i = 50\%$ (noted Δ^{50}) is always defined, and the tangent at inflexion point (noted Δ^{inf}) only exists in sigmoidal curves ($n>1$). These tangents

---

Note présentée par Jean ROCHE.

0764-4469/90/03100065 $ 2.00 © Académie des Sciences

express mortality rates, and their full algebraic expression can also be simplified to the Hill equation

$$\Delta = \Delta_0 + (\Delta_{max} - \Delta_0)/(1 + |\delta/d_i|^{N\Delta}). \quad (4)$$

Δ_{max} is an asymptotic limit, Δ_0 at $d_0 = 0$, N_Δ a constant Hill coefficient and $\delta = d\Delta_{50}$ the dose giving half the maximum variation *i.e.* $(\Delta_{max} - \Delta_0)/2$.

Accordingly, α, β and δ, as well as N_T, N_n and N_Δ are actual toxicological constants in which all parameters are duly contained. In contrast, the LD_{50} derived from the previous equation can be written as equation (*Fig.*, E)

$$LD_{50} = d T_{50} |(T_0 - t)/(t - \tau)|^{1/NT}. \quad (5)$$

This clearly shows that the values of LD_{50} hyperbolically vary as the chosen value of time, so that very large variations can be expected from both choice and from experimental errors especially when $t \sim \tau$.

Mortalities can be expressed in Abbott's units, *i.e.* $m_{i\,A} = 100\,|m_i - m_0|/|100 - m_0|$, as the following resulting function of time:

$$m_{i\,A} = 100\, t^{n'\,i} . d_i^{(ni+NT)}/|(a + \tau . d_i^{NT})^{ni} + t^{ni} . d_i^{(ni+NT)}| \quad (6)$$

where

$$n_i' = n_i + L_n |1 - (t/t_0)^{n\,0} . (T_i/t)^{ni}|/L_n t, \quad (7)$$

$a = T_0 . \alpha$ in Abbott's units.

Then, the maximum mortality that can be reached when $d_i \to \infty$ is a function of time:

$$L_{im} M_{i\,A} (d_i \to \infty) = 100/|1 + (\tau_A/t)^{Nex}| \quad (8)$$

which is always lower than 100% and justifies the need for methods allowing the proper value to be accurately calculated [4].

This study thus proposes new toxicological parameters which are actual algebraic constants and do not depend on experimental choices as is the case for LD_{50} with time. This theory has been illustrated by a first example dealing with the effects of copper (II) sulfate on honeybees (9).

INTRODUCTION. — Depuis plusieurs années, la validité de la DL_{50} en tant que constante biologique a été sévèrement mise en cause ([1], [2]). En outre, les méthodes classiques permettant d'en calculer la valeur [3] ne donnent pas le moyen de déterminer une limite éventuelle de mortalité inférieure à 100 %, en fonction des doses croissantes de toxique. Dans une première étape, nous avons donc proposé l'équation de Hill comme base algébrique permettant de décrire les réponses cinétiques comme les relations doses/effets, qu'elles soient de types sigmoïde ou hyperbolique [4]. Dans le cas des études de létalité, le choix de cette équation repose sur deux remarques principales : d'une part, la mort est le terme ultime d'un processus de développement obéissant à un mécanisme de type cinétique; et d'autre part, le taux de mortalité est un paramètre statistique justifiant le caractère asymptotique de la courbe au voisinage de 100 %. L'équation de Hill exprime donc, dans ce cas, un équivalent de la fonction de répartition, mais avec l'avantage d'un maniement algébrique plus commode et d'une possibilité d'ajustement à un plus grand nombre de phénomènes observables différents. La présente étude décrit maintenant un modèle mathématique simple permettant de caractériser les véritables constantes toxicologiques susceptibles de remplacer la LD_{50} dont l'expression algébrique confirme l'extrême variabilité qui la rend inappropriée.

47

MODÈLE ET RÉSULTATS. — L'expression de la mortalité (m %) d'un organisme vivant en fonction du temps peut être illustrée par une équation du type :

$$m_i = M_{max}/(1+[T_i/t]^{ni}) \quad (1)$$

où $M_{max} = 100$ %, T_i est le temps de demi-survie de la population et n_i le coefficient de Hill (*fig.*, A). En présence d'un toxique (*fig.*, A), les paramètres T_i et n_i sont des fonctions des doses (d_i), selon une équation du même type (*fig.*, B et C).

$$T_i = T_0 - (T_0 - \tau)/(1+[\alpha/d_i]^{NT}) \quad (2)$$

où τ est une limite asymptotique, T_0 le paramètre observé chez les témoins ($d_0 = 0$), α la dose (dT_{50}) provoquant la diminution de moitié de $(T_0 - \tau)$, et N_T le coefficient de Hill et :

$$n_i = n_0 + (n_{ex} - n_0)/(1+[\beta/d_i]^{N\,n}) \quad (3)$$

où n_{ex} est l'extremum asymptotique ($n_{ex} \gtrless n_0$), β la dose (dN_{50}) provoquant la variation demi-maximale de n_i, et N_n le coefficient de Hill (*fig.*, C).

La tangente à la courbe (1) au point correspondant à $m = 50$ % (soit Δ^{50}) et celle au point d'inflexion (soit Δ^{inf}) qui n'existe que dans le cas des courbes sigmoïdes ($n > 1$), sont également des fonctions croissantes des doses selon les équations respectives suivantes :

$$\Delta_i^{50} = 25 \cdot \frac{n_0 \cdot \alpha^{NT} \cdot \beta^{N\,n} + n_0 \cdot \beta^{N\,n} \cdot d_i^{NT} + N_{ex} \cdot \alpha^{NT} \cdot d_i^{N\,n} + N_{ex} \cdot d_i^{(NT+N\,n)}}{T_0 \cdot \alpha^{NT} \cdot \beta^{N\,n} + \tau \cdot \beta^{N\,n} \cdot d_i^{NT} + T_0 \cdot \alpha^{NT} \cdot d_i^{N\,n} + \tau \cdot d_i^{(NT+N\,n)}} \quad (4.1)$$

et

$$\Delta_i^{inf} = 25 \cdot A \cdot B \cdot C,$$

avec

$$\left\{ \begin{array}{l} A = (\alpha^{NT} + d_i^{NT})/(T_0\,\alpha^{NT} + \tau \cdot d_i^{NT}) \\ B = \dfrac{\beta^{2\,N\,n} \cdot (n_0^2 - 1) + 2\,\beta^{N\,n} \cdot (n_0 - 1)\,d_i^{N\,n} + (N_{ex}^2 - 1)\,d_i^{2\,N\,n}}{\beta^{2\,N\,n} \cdot n_0 + \beta^{N\,n} \cdot (n_0 + N_{ex}) \cdot d_i^{N\,n} + N_{ex} \cdot d_i^{2\,N\,n}} \\ C = \dfrac{(n_0+1) \cdot \beta^{N\,n} + (N_{ex}+1) \cdot d_i^{N\,n}}{(n_0 - 1)\,\beta^{N\,n} + (N_{ex} - 1) \cdot d_i^{N\,n}} \exp. \left\{ \dfrac{\beta^{N\,n} + d_i^{N\,n}}{n_0\,\beta^{N\,n} + N_{ex} \cdot d_i^{N\,n}} \right\} \end{array} \right. \quad (4.2)$$

Ces deux équations peuvent chacune se ramener à la même forme, soit (*fig.*, D) :

$$\Delta = \Delta_0 + (\Delta_{max}) - \Delta_0)/(1+[\delta/d_i]^{N\,\Delta}) \quad (4.3)$$

Les limites asymptotique (Δ_{max}), les doses entraînant la variation demi-maximale de Δ (soit $\delta = d\Delta_{50}$) et les coefficients de Hill, N_Δ, sont des fonctions des doses d_i et des paramètres α, δ, N_T et N_n ([5], [6]).

Les relations précédentes permettent d'exprimer la DL_{50} sous la forme suivante :

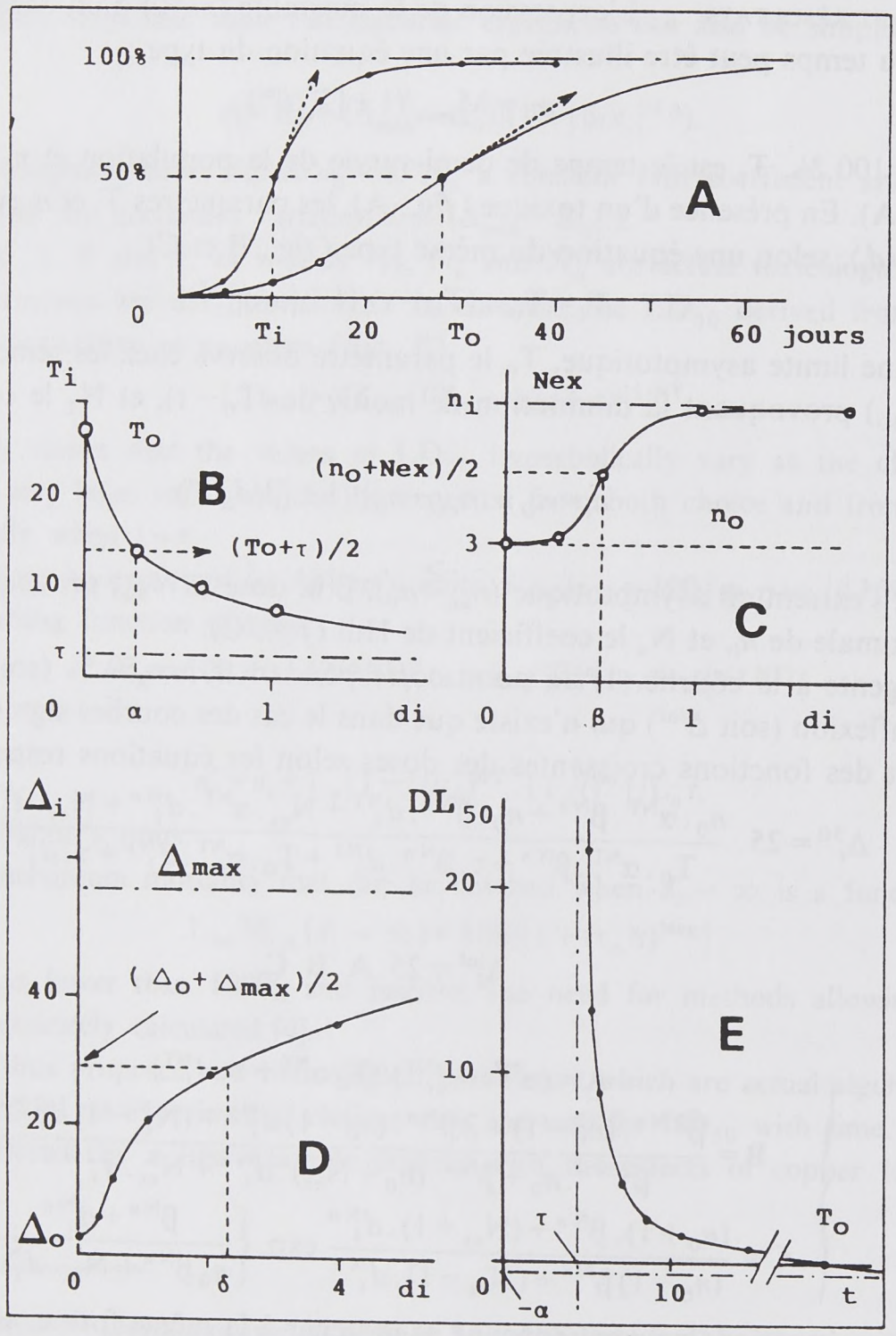
$$DL_{50} = dT_{50} \left(\frac{T_0 - t}{t - \tau} \right)^{1/N_T} \quad (5)$$

qui se traduit par une branche d'hyperbole illustrée par la figure E. Il est intéressant de remarquer que la relation dose/mortalité déduite du modèle et exprimée en coordonnées de Abbott ($m_{i\,A} = 100 \cdot [m_i - m_0]/[100 - m_0]$), est de la forme :

$$m_{i\,A} = 100\,t^{n'i} \cdot d_i^{(ni+NT)}/[(a + \tau_A \cdot d_i^{NT})^{ni} + t^{ni} \cdot d_i^{(ni+NT)}] \quad (6)$$

où a est une constante, τ_A l'équivalent de τ lorsque les mortalités sont exprimées par $m_{i\,A}$, et n_i' donné par :

$$n_i' = n_i + L_n[1 - (t/t_0)^{n\,0} \cdot (T_i/t)^{ni}]/L_n\,t \quad (7)$$



A, exemple modélisé de cinétiques de mortalité correspondant aux paramètres $T_0 = 27$ jours et $n_0 = 3$ pour $d_0 = 0$ et $T_i = 10$ jours, $n_i = 4$ pour $d_i = 0{,}25$ unités. B, relation exprimant T_i en fonction de d_i, donnant $\alpha = dT_{50}$, pour $N_T = 0{,}9$ et $\tau = 3$ jours. C, relation exprimant n_i en fonction de d_i, donnant $\beta = dN_{50}$, avec $N_n = 7{,}5$ et $N_{ex} = 6$. D, variations de Δ_i en fonction de d_i, donnant $235 = d\Delta_{50}$. E, relation déduite entre la DL_{50} et le temps (t) (Unités arbitraires).

A, modelized examples of mortality kinetics with the following parameters: $T_0 = 27$ days, $n_0 = 3$ *for* $d_0 = 0$; $T_i = 10$ *days,* $n_i = 4$ *for* $d_i = 0.25$ *units. B, variations of* T_i *versus* d_i, *giving* $\alpha = dT_{50}$ *for* $N_T = 0.9$ *and* $\tau = 3$ *days.* C, *variations of* n_i *versus* d_i, *giving* $\beta = dN_{50}$, *with* $N_n = 7.5$ *and* $N_{ex} = 6$. D, *variations of* Δ_i *versus* d_i *giving* $\delta = d\Delta_{50}$. *E, deduced relation between* LD_{50} *and time* (t) (*Arbitrary units*).

Dans ce cas, le taux maximal de mortalité pouvant être atteint lorsque $d_i \to \infty$ s'écrit

(8) $$L_{im} \cdot M_{i\,A}(di \to \infty) = 100/[1 + (\tau_A/t)^{N_{ex}}]$$

Cette limite est d'autant plus inférieure à 100 % que t est plus faible devant τ_A.

Enfin, les valeurs correspondant à une DL_x, où $x = 50$ %, se déduisent directement de l'équation (1) à l'aide de la relation :

(9) $$DL_x = DL_{50}\,[x/(100 - x)]^{1/ni}$$

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les paramètres $\alpha = dT_{50}$, $\beta = dN_{50}$, $\delta = d\,\Delta_{50}$, sont des êtres algébriques représentatifs d'authentiques constantes quantitatives, tandis que N_T, N_n et N_Δ sont des constantes qualitatives, associées à la forme des réponses. L'équation (2) précise la notion de « temps correspondant à x % de létalité », déjà abordée par certains auteurs ([7], [8]), le passage de dT_{50} à dT_x s'effectuant à l'aide d'une relation simple [4]. Les paramètres Δ^{50} et Δ^{inf} ne sont pas indépendants, puisqu'ils découlent des valeurs de T_i et n_i, mais ils présentent l'avantage de fournir une réponse doses/effets croissante exprimant les variations de la vitesse de mortalité.

Les paramètres proposés, en tant que constantes algébriques, sont susceptibles de caractériser l'action de toxiques pouvant apparaître comme sublétaux dans des expériences effectuées sur un intervalle de temps limité. Ils offrent, par ailleurs, l'avantage de ne pas être hypothéqués par le choix arbitraire d'un temps au bout duquel la mortalité est observée : or, de ce choix dépendent les valeurs de la DL_{50}, objectivement comprises entre zéro et l'infini. Il s'agit là de l'une des plus graves objections à la persistance de l'utilisation de la DL_{50} comme critère de létalité : elle peut contribuer à expliquer, par exemple, les variations, dans un rapport de 1 à 900, observées dans l'évaluation de ce paramètre, par diverses équipes, chez l'abeille exposée à un même pesticide [9].

Les exemples présentés sur la figure sont des modélisations théoriques établies à partir des paramètres calculés à la suite d'une étude de la toxicité du sulfate de cuivre per os, chez l'abeille [10]. Le modèle est transposable à tous les paramètres biologiques ou physiologiques (mortalités, croissance, etc.) dont la cinétique peut être décrite par l'équation de Hill, chez les animaux, chez les végétaux ou chez les micro-organismes. Il est, par ailleurs, généralisable à d'autres cas, tels que le ralentissement d'une croissance ou l'allongement d'une durée de vie (ce qui introduit alors un phénomène de sens opposé à celui provoqué par les toxiques, par exemple sous l'action de traitements antioxydants [11]). Seul intervient, finalement, le signe de l'expression $(R_{max} - R_0)$.

La précision dans la détermination des paramètres dépend de deux facteurs : d'une part, le nombre de couples de points à partir duquel sont déterminés les paramètres de Hill détermine leur écart type [4]. D'autre part, dans les études de mortalité, la précision de chaque observation dépend du nombre (ν) de sujets, et définit l'intervalle minimal entre deux valeurs successives, soit $100 \times \nu^{-1}$ %. Compte tenu du traitement algébrique des données, les conséquences de l'imprécision qui en découle sont plus accentuées au voisinage de 0-10 % et de 90-100 % de mortalité : une étude particulière est en cours en vue de mieux définir les seuils en deçà ou au-delà desquels les mesures ne doivent pas être prises en compte dans le calcul des paramètres, sous peine de l'introduction d'un facteur de risque excessif. Un logiciel de calcul est en préparation et sera mis à la disposition des toxicologistes souhaitant faire appel au calcul des nouveaux paramètres présentés dans ce travail.

Note remise le 18 septembre 1989, acceptée après révision le 21 décembre 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] G. ZBINDEN et M. FLURY-ROVERSY, *Arch. Toxicol.*, 47, 1981, p. 77-99.
[2] D. O. CHANTER et R. HEYWOOD, *Toxicol. Lett.*, 10, 1982, p. 303-307.
[3] C. L. MILLER et M. L. TAINTER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57, 1944, p. 261-264.
[4] M. BOUNIAS, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 3, 1989, p. 1-10.
[5] M. BOUNIAS, Coll. de la Soc. Biol., Montpellier, 18/5/1989.
[6] M. BOUNIAS, *Bio Math.*, 107, 1989, p. 29-45.

[7] M. I. HAVERTY et T. R. DELL, *Pestic. Sci.*, 15, 1984, p. 369-374.

[8] L. MOLINENGO, *J. Pharm. Pharmacol.*, 31, 1979, p. 343-344.

[9] Associate committee on scientific criteria for environmental quality, Pesticide-Pollinator Interaction, 1981, 194 p.

[10] M. NECTOUX et M. BOUNIAS, *C. R. Soc. Biol.*, 182, 1988, p. 545-556.

[11] S. P. SHARMA et R. WADHWA, *Mechan. Ag. Devel.*, 13, 1983, p. 67-71.

Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A. et Université d'Avignon,
B.P. n° 91, 84140 *Montfavet.*

1°. b

51

PHILIPPE DESBROSSES
avec la collaboration de Stéphane Trano

LA TERRE MALADE DES HOMMES

La Bio-Révolution

Éditions du Rocher
Jean-Paul Bertrand
Éditeur

du maintien de la santé. Jusqu'ici les médecins en avaient peu conscience.

Il y aurait en France 2,6 millions de malades atteints de calculs rénaux et biliaire. Bravo, continuons dans cette voie. C'est une mine d'or pour les chirurgiens !

ANNEXE N° 4

D.L. 50 *.
LA DÉTECTION DES EFFETS TOXICOLOGIQUES : UNE ILLUSION DE SÉCURITÉ

Professeur Michel Bounias D. Sc

« Dormez, bonnes gens !... » Soyez sans crainte, citoyens, l'État vous protège : ses lois et ses réglementations sont là pour veiller sur votre sécurité. Pendant des siècles, les lois en question ont été tour à tour l'expression de décisions individuelles ou de diverses formes de consensus. De nos jours encore, elles peuvent être facilement transformées, voire inversées au gré des législatures successives, sans que les conséquences paraissent dépasser le cadre d'un certain confort matériel, intellectuel ou moral.

Mais lorsque la législation aborde un domaine aussi crucial que celui de la toxicologie *, la réthorique ne lui est plus d'aucune utilité : la science n'est pas une affaire d'opinions mais de faits, de calculs et de théories raisonnées. En principe, du moins. Car en pratique, l'expérience montre que la culture du flou et de la mouvance est moins vulnérable aux gelées de printemps que celle des fruits et légumes.

La nécessité du savoir antérieur

Une commission dite « scientifique » écarta, voici quelques années, un projet de recherches visant à la protection toxicologiques des abeilles, sous le prétexte qu'il s'agissait d'un sujet « susceptible de donner matière à une thèse de doctorat, et trop fondamental pour être proposé aux instances régionales en vue de financement ».

Cette malencontreuse démonstration d'incompétence révèle, cependant, le caractère quelque peu occulte qui imprègne cette discipline ambiguë qu'est la toxicologie.

Rien, en effet, n'est trop fondamental, dans un tel domaine : comment pourrait-on espérer déceler les anomalies d'une mécanique dont on ne connaîtrait pas le fonctionnement normal ? Or, il se trouve que les « ratés » de la machine vivante sont souvent très difficiles à mettre en évidence, comme vont le montrer quelques exemples caractéristiques.

Qu'est-ce qui est normal ?

L'une des propriétés communes à tous les êtres vivants est leur capacité de régulation, qui leur permet de maintenir leur organisation interne et les concentrations de leurs composants intra-cellulaires à un niveau sensiblement constant. Il s'agit de l'homéostasie.

Lorsqu'un malade, sur ordonnance du médecin, va se soumettre à des examens de laboratoire, les résultats lui sont communiqués sous forme de listes comportant les valeurs obtenues dans son cas (sucre, cholestérol, etc.) ainsi que les limites inférieures et supérieures considérées comme « normales » *. Cela permet, malheureusement, à des patients qui ont dix pour cent en trop ou en moins de tel ou tel composant, par rapport aux limites indiquées, de s'inquiéter à propos de leur état.

Or, la simple comparaison des résultats de dosages individuels ne revêt qu'une signification très limitée. Les milliers de substances biochimiques contenues dans l'organisme sont toutes en interaction les unes avec les autres. Il est alors normal qu'à un moment, les cellules contiennent moins de « ceci », si en contrepartie elles recèlent plus de « cela ». J'avais, il y a longtemps, montré que chez les végétaux, par exemple, les teneurs en chlorophylles et en caractère sont des fonctions inverses de celles en

* La D.L. 50 est le test toxicologique officiel par lequel doivent passer tous les produits mis en vente sur le marché.

* Encore faut-il préciser qu'en l'absence d'indication du nombre de cas ayant servi à établir cette « fourchette » (écart-type en jargon technique), celle-ci ne peut être d'aucune utilité pratique, aucune comparaison statistique n'étant

• La D.L. 50 est le test toxicologique officiel par lequel doivent passer tous les produits mis en vente sur le marché.

certains acides aminés libres, tandis que le glucose varie dans le même sens que la chlorophylle. A [1-2-3].

Plus tard, en étudiant la biochimie des insectes, j'ai observé des relations inverses entre le glucose et les acides gras, chez

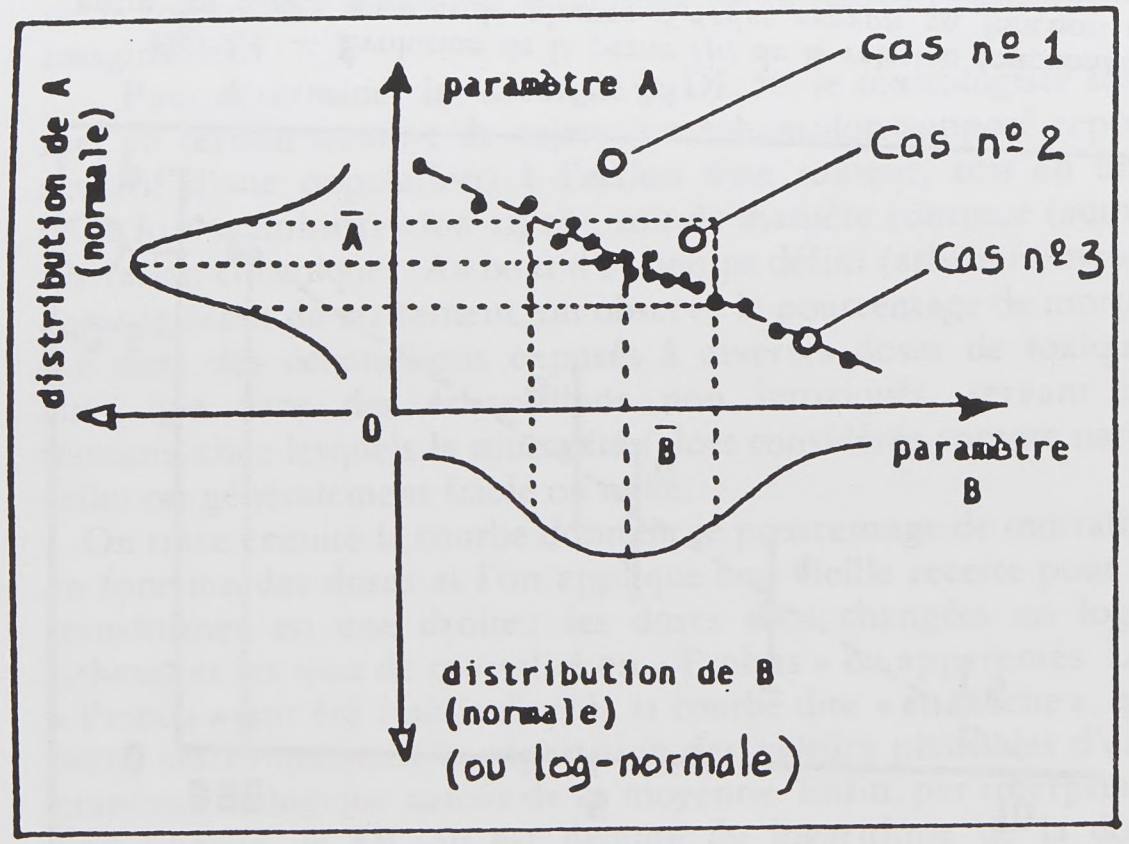


Fig. 1. A. — Le concept de « concentrations normales ».

Les « courbes en cloche » délimitent la moyenne (sommet de la courbe) et l'écart-type des paramètres A et B.

Le rectangle central (en pointillés) définit la zone à l'intérieur de laquelle les concentrations peuvent être tenues pour normales. Pourtant, si les variables A et B sont liées par une relation fonctionnelle (ici : une droite de pente négative), trois cas particuliers peuvent se présenter :

— Cas nº 1 : point anormal (hors de la relation et hors des limites de valeurs normales).
— Cas nº 2 : point anormal car hors de la relation, *bien que* les valeurs soient dans la zone normale.
— Cas nº 3 : point normal car sur la relation, *bien que* les valeurs soient hors de la zone normale.

N.B. : La pente d'une relation fonctionnelle peut varier sous l'action de doses croissantes d'un toxique (cf. fig. 1 B).

servi à établir cette « fourchette » (écart-type en jargon technique), celle-ci ne peut être d'aucune utilité pratique, aucune comparaison statistique n'étant

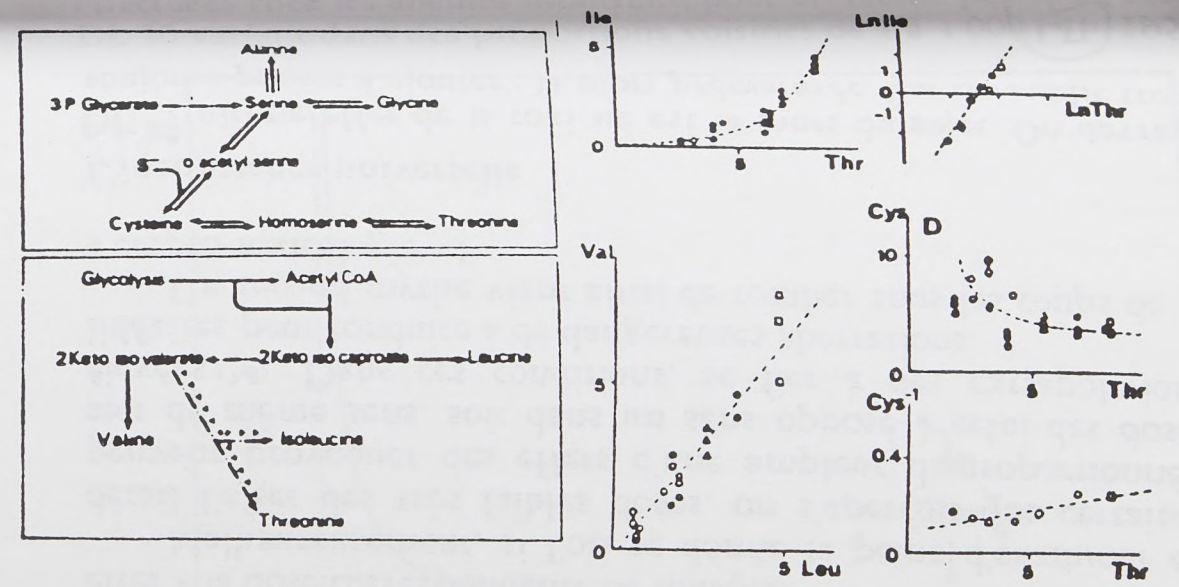


Fig. 1. B. — Les relations biochimiques fonctionnelles.

A gauche : schéma de quelques voies métaboliques.

A droite : relations fonctionnelles correspondantes, linéaires ou linéarisées par une transformation algébrique appropriée.

Corrélations positives : ⇉ (relations directes)
Corrélations négatives : ⇄ (relations inverses)

(Extrait de : *J. Invert. Pathol.*, 1989.)

l'abeille, entre divers amino-acides ainsi qu'entre divers glucides et lipides, chez le moustique [4-5-6]. De tels phénomènes constituent des relations fonctionnelles, que l'on peut décrire mathématiquement, à l'aide d'équations... [7].

L'état normal pour l'organisme, c'est alors que les concentrations respectives de deux composés A et B, portées l'une en abscisse et l'autre en ordonnée sur un graphique, désignent un point situé sur la courbe représentative de la relation fonctionnelle mesurable chez les individus sains. La majorité des points se situe, certes, vers la partie médiane de la courbe, mais il est tout à fait logique de trouver une proportion d'individus pour lesquels les valeurs mesurées situent les points correspondants vers l'une ou l'autre des extrémités de la courbe. Dans ce cas, les valeurs numériques observées s'écartent des limites considérées comme « normales », bien que le sujet ne doive en aucun cas être considéré comme anormal ! Inversement, si les concentrations de A et de B s'inscrivent à l'intérieur de la fourchette habituelle, mais de telle sorte que le point correspondant ne soit pas situé sur la courbe caractéristique de la relation fonction, alors nous sommes en présence d'une perturbation.

Les dangers de la ligne droite

Lorsqu'un effet toxique est observé sous l'action d'une certaine dose de « poison », un effet plus important se produit généralement à dose plus élevée et réciproquement. Cela conduit à ce que l'on nomme : les relations doses-effets. Comme l'ampleur de l'effet n'est pas nécessairement proportionnelle aux doses de toxique, on procède volontiers à des changements algébriques d'unités (tels que la transformation des valeurs numériques des doses en leur logarithme, en leur inverse, etc.) de manière à ce que la relation dose-effet devienne une droite.

Il est alors tentant d'extrapoler la droite jusqu'au seuil où l'effet observé serait théoriquement nul, et d'appeler « dose sans effet » la dose correspondante de toxique.

Malheureusement, si l'on se donne la peine d'examiner en détail l'effet des très faibles doses, on s'aperçoit que certaines peuvent provoquer des effets d'une ampleur disproportionnée, soit de même sens, soit dans un sens opposé à celui des doses élevées [7-8]. Dans ces conditions, se fier à des extrapolations linéaires peut conduire à de dangereuses aberrations.

Un second mythe vient ainsi de tomber sous les coups de la « crypto-toxicologie » !

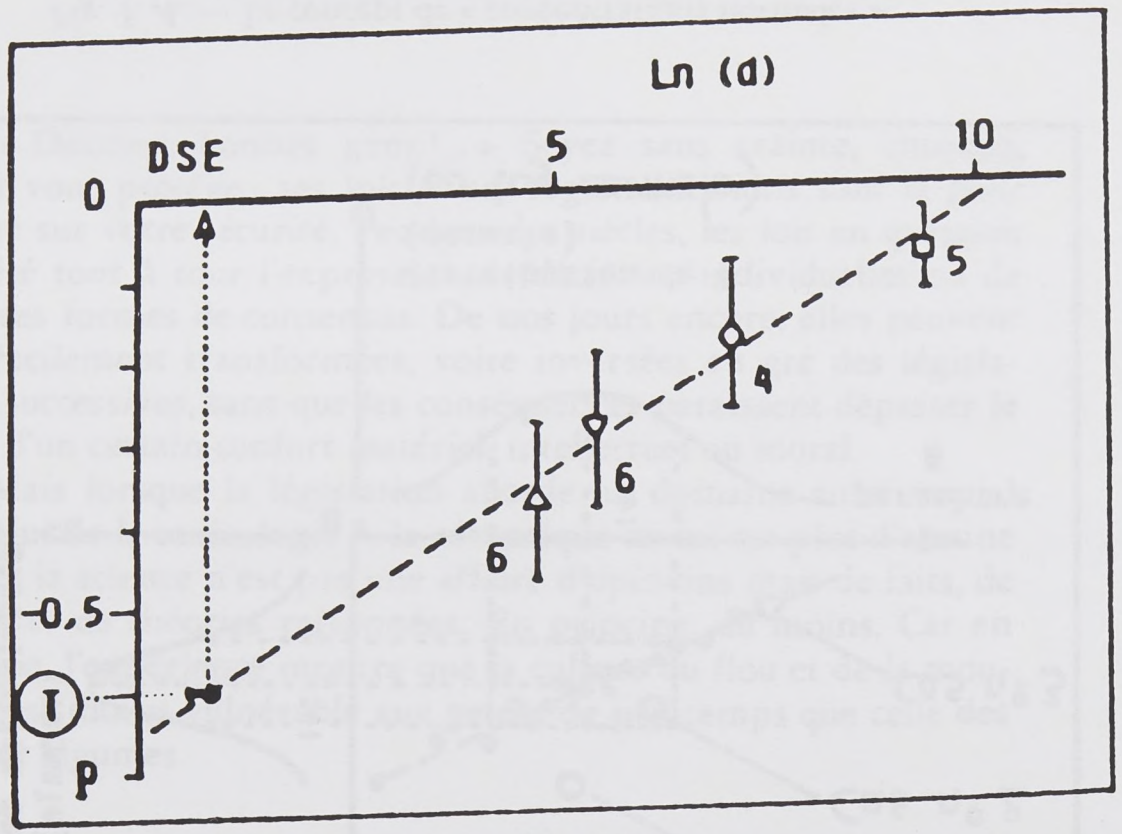


Fig. 2A

Fig. 2A. — Évolution de la pente *(p)* de la relation fonctionnelle entre les acides gras et le glucose d'*Aedes aegypti* en fonction des doses *(d)* de toxine exprimées en u. i. : (Δ) = 120 u. i. ; (∇) = 240 u. i. ; (◇) = 1 200 u. i. ; (□) = 12 000 u. i. Les valeurs observées chez les témoins sont désignées (T). Le nombre de mesures ayant conduit au calcul des pentes figure en regard de chaque point. Les pentes sont exprimées en nombres sans dimension (mM par mM).

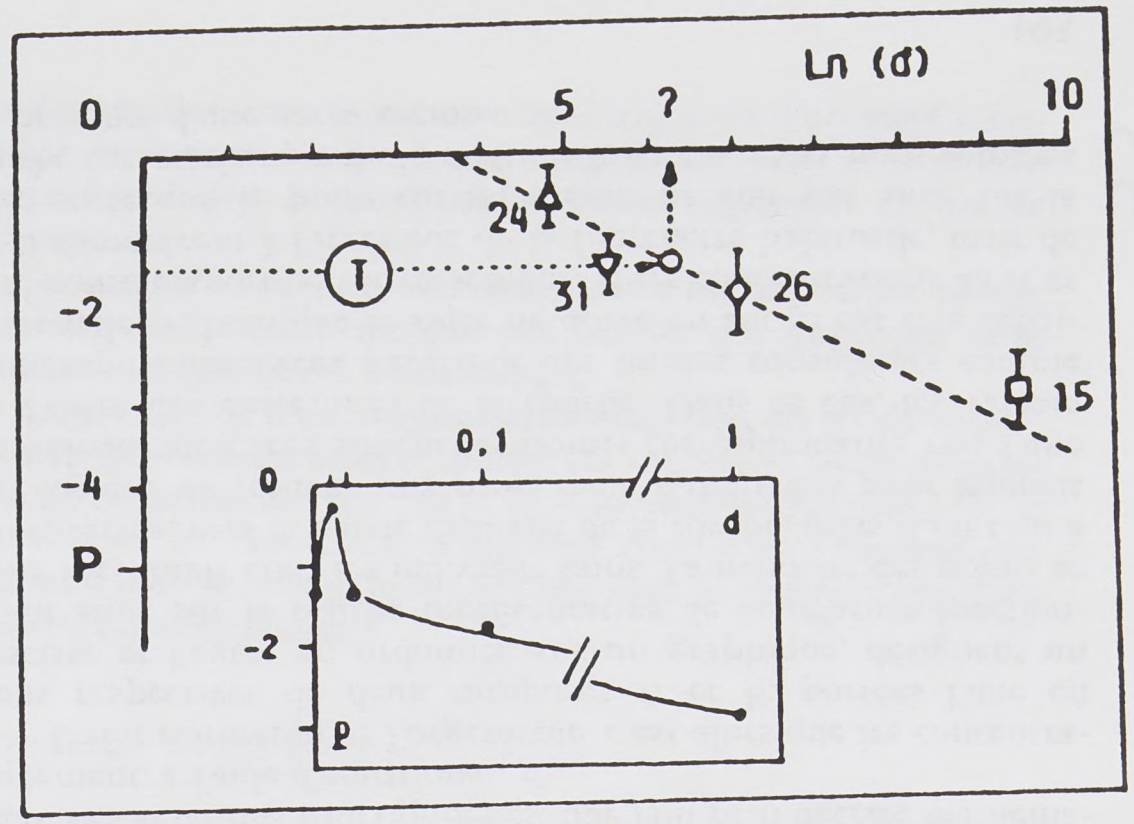


Fig. 2B

Fig. 2B. — Évolution de la pente *(p)* de la relation entre la cystéine et la sérine de l'hémolymphe d'*Aedes aegypti* en fonction des doses *(d)* de toxine (u. i.). Mêmes symboles que sur la figure 1. Une représentation en coordonnées non transformées est indiquée en encart.

L'inconstance universelle

L'ultime effet de la toxicité est la mort du sujet. On devrait toujours penser à ajouter : la mort *prématurée*. Car on oublie trop souvent que les individus sains ont, eux aussi, une durée de vie d'incertitude. Ceci est confirmé, en pratique, puisque des mesures

exprimées en nombres sans dimension (mM par mM).

souvent que les individus sains ont, eux aussi, une durée de vie limitée. Or, depuis 50 ans, les toxicologistes ont inventé le concept de « dose provoquant 50 % de mortalité » (la DL 50) qui n'a de sens que si l'on ajoute « dans des conditions déterminées » ! Le problème mérite d'être examiné de plus près, car la DL 50 est universellement utilisée depuis un demi-siècle, pour l'évaluation de la toxicité de toutes les catégories de substances possibles et imaginables.

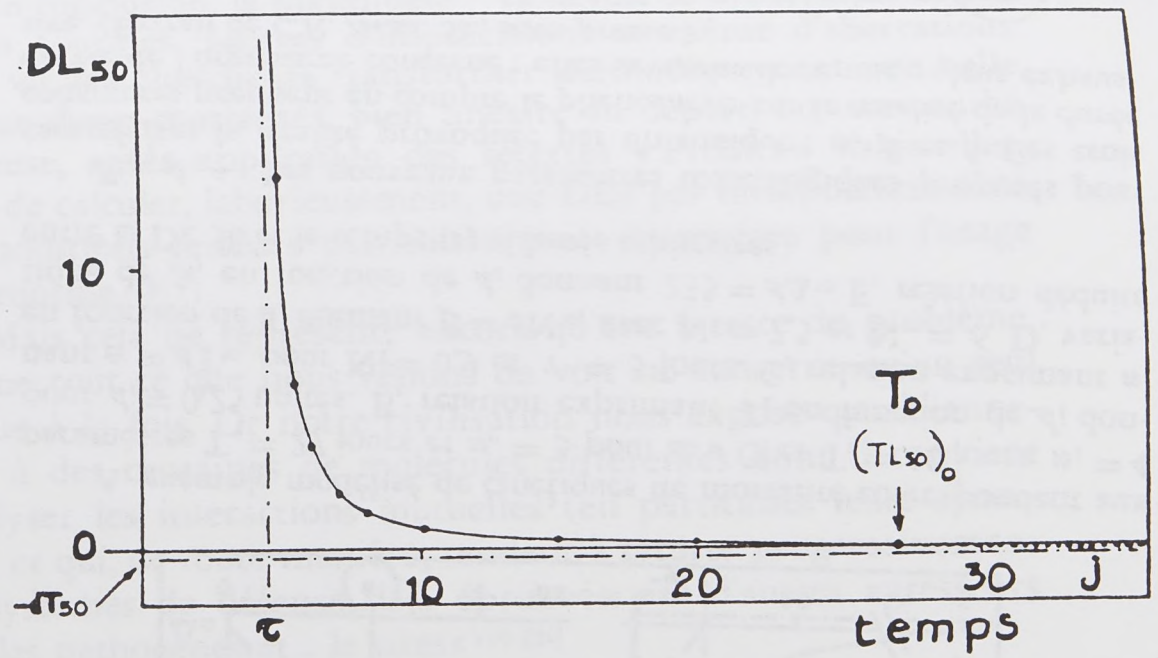
Pour déterminer la valeur de la DL 50, le toxicologiste soumet un certain nombre de sujets (un échantillon supposé représentatif d'une population) à l'action d'un toxique, soit en une seule fois (administration aiguë), soit de manière continue (administration chronique). Au bout d'un temps défini (arbitrairement) après le début du traitement, on observe le pourcentage de mortalité dans des échantillons exposés à diverses doses de toxique, ainsi que dans des échantillons non intoxiqués, servant de témoins, chez lesquels la mortalité (alors considérée comme naturelle) est généralement faible ou nulle.

On trace ensuite la courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction des doses et l'on applique une vieille recette pour la transformer en une droite : les doses sont changées en logarithmes et les taux de mortalité en « Probits » ou apparentés. Les « Probits » ont été établis d'après la courbe dite « en cloche », qui décrit statistiquement la répartition des valeurs plausibles d'une grandeur biologique autour de sa moyenne. Enfin, par interprétation linéaire, la DL 50 est déduite du logarithme de la dose constatée sur la courbe au point correspondant au « Probit » de 50 % de mortalité.

Cette DL 50 n'est pas une constante biologique, il s'en faut de beaucoup. La nature des sujets d'expérimentation : leur espèce, leur âge, leur mode d'élevage, etc., influent beaucoup sur les résultats [11]. Mais il y a plus grave : selon le temps au bout duquel on observe les taux de mortalités, après les traitements, les valeurs numériques de la DL_{50} peuvent objectivement varier de zéro à l'infini comme l'ont montré à la fois une théorie générale du phénomène de mortalité [12] et la première application expérimentale qui en a été effectuée [13].

Autrement dit, le choix de ce délai entre l'administration du toxique et la mesure des taux de mortalité peut faire apparaître une même substance soit comme très toxique, soit comme très peu toxique ! Qui plus est, dans ce dernier cas, on doit s'attendre, pour des raisons purement algébriques, à une très grande marge

d'incertitude. Ceci est confirmé, en pratique, puisque des mesures effectuées chez les abeilles montrent, pour un même pesticide, des DL 50 variant dans des proportions voisines de 1 à 1 000 ! [14].



$$DL_{50} = d\,T_{50}\left(\frac{T_0 - t}{t - \tau}\right)^{1/N_T}$$

Fig. 3A. — Étude théorique de la DL 50 : calcul des variations en fonction du temps au bout duquel les mortalités sont observées (graphe établi d'après des données arbitraires. Extrait de *Bio Math.*, 1989).

C'est ainsi que se profile la fin d'un troisième mythe.

J'ai proposé de nouvelles voies permettant de mieux caractériser les relations doses-effets et de définir, en remplacement de la DL 50 (condamnée à brève échéance), de nouveaux paramètres ayant les propriétés de véritables constantes mathématiques, indépendantes de tout choix arbitraire de la part des expérimentateurs [15]. Mais cette nécessaire réforme n'ira pas sans quelques bouleversements...

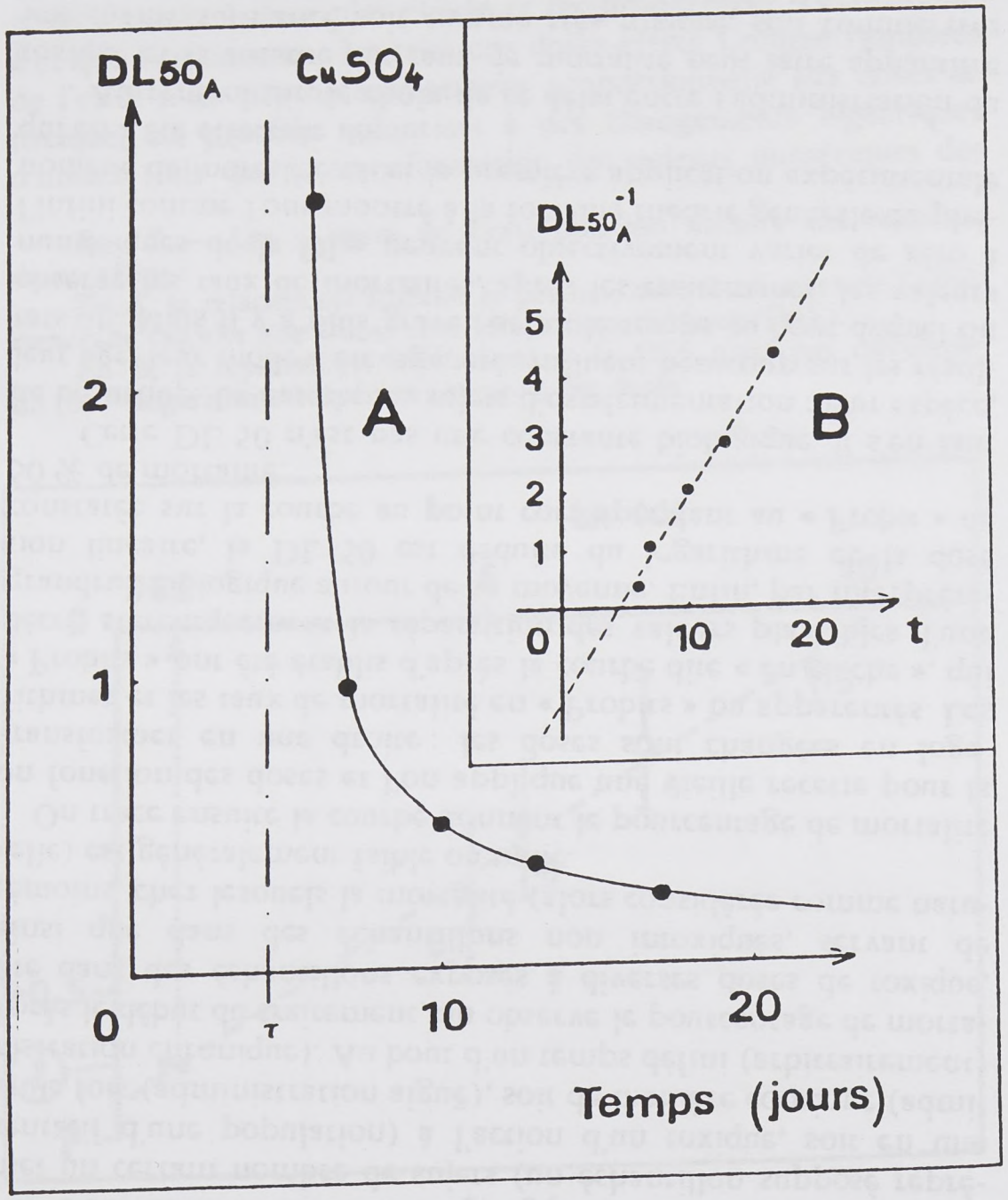
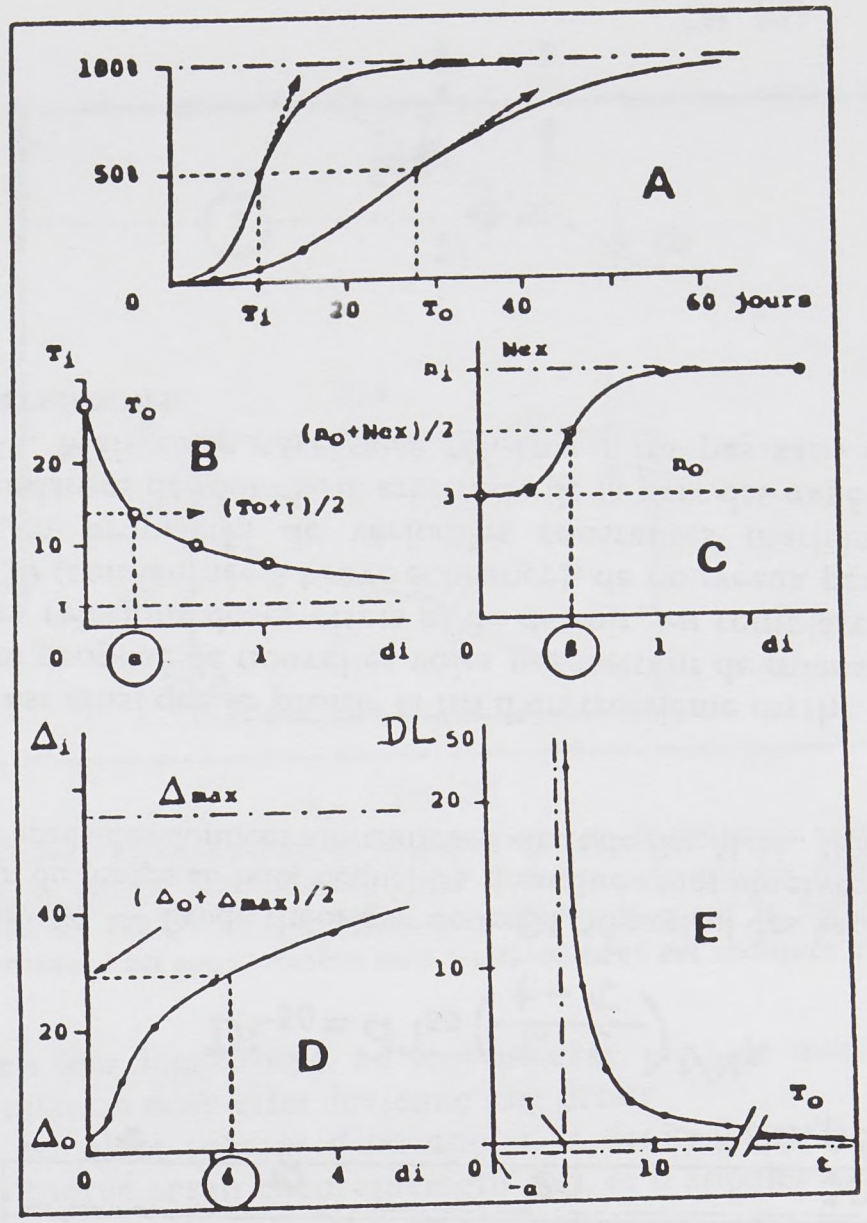


Fig. 3B. — Étude expérimentale de la variabilité de la DL 50 : cas de l'administration chronique de sulfate de cuivre aux abeilles adultes. La courbe présentée correspond aux données corrigées selon Abbott, c'est-à-dire aux mortalités corrigées par rapport aux témoins. Il est clair qu'au voisinage de τ les incertitudes deviennent très grandes... (Extrait de *C.R. Soc. Biol.*, 1989.)



A, exemple modélisé de cinétiques de mortalité correspondant aux paramètres $T_o = 27$ jours et $n_o = 3$ pour $d_o = 0$ et $T_i = 10$ jours, $n_i = 4$ pour $d_i = 0{,}25$ unités. B, relation exprimant T_i en fonction de d_i donnant $\alpha = dT_{50}$, pour $N\tau = 0{,}9$ et $\tau = 3$ jours. C, relation exprimant n_i en fonction de d_i donnant $\beta = dN_{50}$, avec $N_o = 7{,}5$ et $N_{ex} = 6$. D, variations de Δ, en fonction de d_i donnant $235 = d\Delta_{50}$ E, relation déduite entre la DL 50 et le temps (t) (Unités arbitraires).

Fig. 4. — Les nouveaux paramètres toxicologiques proposés pour caractériser la létalité provoquée par un toxique : α, β et δ. Ces trois constantes prennent en compte le phénomène sur la totalité de la durée de vie de l'organisme concerné : elles revêtent donc une valeur exhaustive. (Extrait de *C.R. Acad. Sc.*, sous presse.)

La vie dure toute la vie !

Cette tautologie avait pourtant échappé, jusqu'ici, aux toxicologistes. En effet, décider que l'on va considérer la DL 50 au bout de 24 heures, 48 heures ou 4 jours après administration du toxique, cela revient à dire à peu près ceci, en transposant à l'homme : supposons qu'un individu soit intoxiqué à l'âge de vingt ans. Nous le plaçons sous surveillance jusqu'à 25 ou 30 ans pour voir si dans l'intervalle il va survivre ou non, et après cela, l'expérience est terminée et nous en aurons tiré une information globalement suffisante.

Quant à savoir ce qui se passera ensuite, en particulier si sa durée de vie totale sera plus ou moins abrégée, peu importe ; passé 30 ans, il n'intéresse plus la science. Même s'il meurt à 40 ans au lieu des 75 auxquels il peut prétendre...

Ma conclusion sur ce point, au terme de l'étude théorique, est qu'il est indispensable de procéder à des observations durant la totalité de la durée de vie des sujets, faute de quoi les conclusions ne peuvent être que fragmentaires. Et si les sujets vivent jusqu'au bout : la connaissance, donc la sécurité, sont à ce prix... et seulement à ce prix.

Toxicité et mortalité

La dernière question résume l'essentiel de mes objectifs de recherche actuels en toxicologie : peut-on concevoir l'existence d'une différence fondamentale entre toxicité et mortalité ? Dès lors qu'un toxique provoque à court terme des perturbations biochimiques chez un organisme, quels sont les facteurs qui contrôlent la répercussion de ces effets sur sa durée de vie totale ?

Il est évident que, parmi ces facteurs, l'activité des sujets est déterminante.

Ainsi, tel pesticide qui affecte la régulation de la glycémie de l'abeille [16-17] n'entraînera la mort (prématurée) de l'insecte que lorsque celui-ci aura à contrôler l'utilisation de ses réserves d'énergie au cours de son travail de butinage et de récolte du pollen et du nectar dont il aura à ramener à la ruche des quantités importantes, eu égard à son propre poids. Sur le terrain, la butineuse s'effondrera en cours de route, alors que, confortablement logée dans une cagette de laboratoire, elle n'aura qu'à attendre, immobile, que la crise soit passée. D'où la nécessité de recourir à

des épreuves fonctionnelles, par exemple des « tests à l'effort », même pour les insectes !

En conclusion, la toxicologie * va devoir se débarrasser de ses vieilles routines, sources d'imprécisions et même d'aberrations (on a vu des chercheurs transformer méthodiquement une belle réponse doses-mortalités, bien linéaire au départ, en une courbe tortueuse, après application des recettes « Probits » habituelles, avant de calculer, laborieusement, une DL_{50} par intrapolation dans des conditions rendues particulièrement mauvaises pour l'usage de la routine [18] !)

Mais cela ne représente encore qu'une facette du problème, puisque tout ce que nous venons de voir ne concerne qu'un seul toxique à la fois. Or notre civilisation nous expose quotidiennement à des centaines de molécules différentes dont il convient d'analyser les interactions mutuelles (en particulier leurs synergies), et qui, de toute manière, tendent à saturer progressivement nos systèmes de défense déjà éprouvés par d'autres agresseurs dont les pathogènes et... le stress [19-20] !

Pour être complet, il faudrait souligner la difficulté de transposer les résultats d'expérimentations sur les molécules isolées à la cellule entière, de la cellule à l'organisme, et d'une espèce à une autre.

Si l'on peut sans encourir les foudres des « antivivisectionnistes » tremper des escargots ou des homards vivants dans l'eau bouillante (gastronomie autorise !), l'utilisation d'animaux de laboratoire va devenir de plus en plus difficile. L'issue du mouvement ne fait alors aucun doute, et nous sommes entrés dans une nouvelle phase de la toxicologie, même sans l'avoir voulu :
L'ère de l'expérimentation humaine...

57

• La DL 50 est le test toxicologique officiel par lequel doivent passer tous les produits mis en vente sur le marché.

2º

59

C. R. Acad. Sci. Paris, t. 310, Série III, p. 1-6, 1990

Biochimie appliquée/*Applied Biochemistry*

Régulation biphasique dans les interactions ligands-récepteurs : action de l'ion cuivrique sur la glucosémie de l'abeille et de l'ion phosphite sur les phosphatases foliaires du poivron

Michel Bounias, Myriam Nectoux et Roselyne Lorient

Résumé — La glucosémie, reflétant l'activité des tréhalases de l'abeille, et l'activité des phosphatases neutres du poivron, présentent respectivement sous l'action de concentrations croissantes de sulfate cuivrique et de phosphite de sodium, une stimulation transitoire suivie dans le premier cas d'un retour à la normale et dans le second d'une inhibition progressive. De tels phénomènes peuvent être décrits par l'équation représentative d'une interaction ligand-récepteur sous l'action d'un régulateur agissant successivement comme activateur sur le complexe ligand-récepteur puis comme inhibiteur partiel ou total sur le complexe activité.

Biphasic regulation in ligand-receptor interactions: action of cupric ions on the honeybee glucosemia and of phosphite ions on foliar phosphatases of pepper

Abstract — *The honeybee glucosemia, reflecting trehalase activity and the neutral phosphatases of pepper leaves show, under the respective action of increasing concentrations of cupric sulfate and sodium phosphite, a transient stimulation. In the 1st case this is followed by a returning to normal values and in the second by a gradual inhibition. Such phenomenona can be described by the representative equation of a ligand-receptor interaction in which a regulator would successively act as an activator on the ligand-receptor complex and as a partial complete inhibitor on the activated complex.*

Abridged English Version — The biphasic control of ligand/receptor interactions involves the alternative action of an activation and an inhibition phase. Such features have been experimentally observed in various enzymic ([1], [2]) and hormonal ([3], [4], [5]) processes. Our work describes two new cases of such a mechanism (*Fig.* 1 A and C) which may both appear as particular cases of the general molecular scheme of interactions illustrated by Figure 2. The equation derived from this model can be written as follows:

$$v_R = U_0 \cdot L/(h_0 + L) + U_A \cdot L/(h_A + L) + U_i \cdot L/(h_i + L)$$

$$U_0 = V_{M_0}/[1 + (R/K'_A)(1 + R/K'_i)]$$

$$h_0 = K_L (1 + R/K_A)(1 + R/K_i)/[1 + (R/K'_A)(1 + R/K'_i)$$

$$U_A = V_{M_A}/[1 + K'_A/R + R/K'_i]$$

$$h_A = K_L \cdot K'_A [1/R + (1/K_A)(1 + R/K_i)/(1 + K'_A/R + R/K'_i)$$

$$U_i = V_{M_i}/[1 + (K'_i/R)(1 + K'_A/R)]$$

$$h_i = K_L K'_i/K_i + [1 + K_A/R] K'_i/R) K'_A/K_A (1 + [1 + K'_A/R] K'_i/R)$$

where v_R = resulting response (generally a velocity), L = ligand concentrations, R = regulator concentrations, and the various dissociation constants are as follows: K_L for the ligand/receptor (L-R) complex, K'_L, K''_L respectively for the activated and inhibited complexes, K_A, K'_A for the activated receptor and L-R complex, respectively, and K_i, K'_i for the corresponding inhibited complexes. V_{M_0} is the maximum response in the absence of regulator, V_{M_A} and V_{M_i} are the respective maximum responses of the activation and inhibition steps, respectively.

Note présentée par Jean Roche.

0764-4469/90/03100001 $ 2.00 © Académie des Sciences

It is noteworthy that the mechanism can be reversed with an inhibition followed by an activation.

Thus, the control of honeybees (*Apis mellifica, mellifica* L.) glycemia by copper (II) sulfate (used in the control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni*) [6] would correspond to the particular case where $V_{M_i}/V_{M_0}=(K''_L+L)/(K_L+L)$ (*Fig.* 1 A and B). The involved receptor is likely to be trehalase since (*a*) a trehalase inhibitor suppresses the observed phenomenon, and (*b*) a close correlation was observed, in our experimental conditions, between the haemolymph glucose concentrations and the trehalase velocities. The control of the alkaline phosphatases of pepper (*Capsicum annuum* leaves) by phosphite ions (used as a stimulator of the plant resistance to mildew) [7] would correspond to the particular case where $V_{M_i}=0$ (*Fig.* 1 C and D). It should be noted that the general equation allows the response to increasing regulator concentrations to decrease, after the activation phase, to values that can be higher or lower than the initial level, according to the relation: $V_{\lim (R \to \infty)}=V_{M_i}.L/(K''_L+L)$. The comparison of our experimental data with the theoretical ones obtained from the appropriate equations allows close correlations to be obtained. The respective coefficients are $\rho=0.978$ and $\rho=0.993$ for the copper/trehalase and the phosphite/phosphatase interactions.

Regardless of the possible respective Hill coefficients affecting the ligand (L) and the regulator (R) concentrations, the space of parameters involves at least six independent dimensions, for example: V_{M_A}, V_{M_i}, K_A, K_i, K'_A, K'_i. The rational determination of these parameters remains a difficult task, likely by use of topological studies, which is the aim of our work in progress.

Introduction. — Qu'il s'agisse de réactions enzymatiques ([1], [2]) ou d'interactions hormonales, chez l'animal [3] comme chez le végétal ([4], [5]), un nombre croissant de phénomènes sont décrits sous la forme d'une activation suivie d'une inhibition progressive vers une limite asymptotiquement nulle ou non nulle, sous l'action de concentrations croissantes d'un effecteur pouvant être naturel ou xénobiotique.

De récentes recherches sur la lutte contre des parasites animaux et végétaux nous ont permis de mettre en évidence deux nouveaux cas présentant de telles caractéristiques : l'un concerne l'action du sulfate de cuivre, expérimenté contre la varroatose de l'abeille [6], sur les tréhalases de l'hôte, et l'autre a été découvert lors d'une étude du mode d'action de l'éthyl phosphite d'aluminium, comme stimulateur de la résistance de certains végétaux aux pathogènes fongiques [7], sur les phosphatases foliaires du poivron. Le présent travail présente un modèle moléculaire dont l'équation représentative serait de nature à rendre compte des résultats observés, et de leur apporter ainsi une base plausible d'interprétation, à l'échelle moléculaire.

Matériel et techniques. — Les abeilles ouvrières (*Apis mellifera, mellifera* L.), prélevées au stade d'adultes naissantes à la sortie des alvéoles operculées, ont reçu des injections de $CuSO_4$, 5 H_2O seul, ou en présence d'un inhibiteur des tréhalases (BAYg 5421) *in vivo*, à raison de 0,25 à 8 nmoles par individu, dans 0,5 µl d'eau. Des lots de cinq abeilles ont été utilisés pour chaque série de mesures et les expériences ont été répétées au moins 3 fois. La glycémie a été analysée comme précédemment [1]. Les coefficients de variations ont été de 0,24.

Les phosphatases neutres (pH 7,4) des feuilles de poivron (*Capsicum annuum*) de la variété « Phyo » ont été extraites par broyage de 100 mg de feuilles fraîches en milieu

61

tampon Tris HCl 50 mM, centrifugation 15 mn à 5 000 g, et chromatographie du surnageant sur colonne de Biogel P-6 DG. La réaction est mesurée par enregistrement en continu de la coloration apparue à 410 nm au cours de l'hydrolyse du para-nitro phényl phosphate employé comme substrat chromogène à la concentration constante $S = 8$ mM. Deux séries indépendantes de deux mesures chacune ont donné des coefficients de variation de 0,06. L'activité des tréhalases de l'hémolymphe est mesurée par incubation de 10 µl d'hémolymphe pour 200 µl de volume réactionnel final, en présence de 1 mM de tréhalose, en milieu tampon phosphate 100 mM, pH 6,8. Le glucose libéré au bout de 60 mn d'incubation à 30 °C est déterminé par chromatographie [1]. Les coefficients de corrélation sont désignés par ρ, les pentes de régression par b et leur écart-type par σ. Les probabilités de signification sont calculées d'après l'équation de distribution de « t » de student.

Résultats expérimentaux. — La figure 1 A décrit l'action du sulfate de cuivre sur la glucosémie de l'abeille. Le glucose est le seul produit de l'action des tréhalases, et dans nos conditions expérimentales, une forte corrélation positive a été observée entre les variations de la glucosémie *in situ* et celles de l'activité tréhalasique correspondante : pour $N = 6$, $\rho = +0{,}90$ ($P < 0{,}02$). Enfin, la libération de glucose observée est entièrement éliminée par l'injection simultanée d'un inhibiteur des tréhalases : pour une concentration $C = 29{,}9 \pm 1{,}8$ mM libérée au pic d'activité, l'injection simultanée du BAYg 5421 ramène la valeur à $0{,}34 \pm 0{,}13$ mM, soit au même ordre de grandeur que chez les témoins recevant du BAYg 5421 seul : $C = 0{,}84 \pm 0{,}10$ mM ($N = 3$ mesures dans chaque cas).

La figure 1 C décrit l'action de l'ion phosphite sur les phosphatases foliaires du poivron. A partir du sommet de la courbe, la vitesse décroît en proportion inverse de la concentration (C) de l'effecteur : pour $N = 5$, la corrélation est extrêmement forte : $\rho = +0{,}994$ ($P < 0{,}001$) et l'équation a pour expression : $v^{-1} = 0{,}0028 \cdot C + 0{,}105$. La vitesse tend donc vraisemblablement vers zéro lorsque la valeur de C tend vers l'infini.

Discussion et conclusions. — Les deux exemples expérimentaux présentés résultent chacun de l'interaction moléculaire d'une enzyme avec un effecteur xénobiotique. Dans le cas des tréhalases de l'abeille, nous avons établi les courbes les plus caractéristiques en coordonnées relatives, qui éliminent toute interférence de la réaction aminergique consécutive à la manipulation des animaux. Dans le cas des phosphatases végétales, le phénomène est en cours d'étude, en relation avec la stimulation de la résistance du poivron au mildiou. Il diffère notablement des résultats observés à partir des phosphatases intestinales d'abeilles, qui ne présentent que la phase d'activation. La figure 2 décrit un schéma plausible dans lequel le régulateur (R) se comporte successivement vis-à-vis du récepteur (P) ou du complexe ligand-récepteur (PL) comme activateur puis comme inhibiteur des complexes activés. Un tel schéma, suggéré récemment par Keleti (1986) [8] n'a, cependant, pas été développé de manière explicite. La vitesse initiale (v_R) résulte de la somme des vitesses individuelles associées aux trois complexes compétents du ligand :

$$v_0 = -d(\mathrm{PL})/dt = k_1(\mathrm{PL}) \tag{1}$$

$$v_A = -d(\mathrm{PLR})/dt = k_2(\mathrm{PLR}) \tag{2}$$

$$v_i = -d(\mathrm{PRLR})/dt = k_4(\mathrm{PRLR}) \tag{3}$$

avec, pour simplifier, $k_2 = k_3$ et $k_4 = k_5$.

Les réponses maximales théoriques, liées à ces trois cas, étant : $V_{M_0} = k_1(P_{tot})$; $V_{M_A} = k_2(P_{tot})$ et $V_{M_i} = k_4(P_{tot})$; $(P_{tot}) = (P) + (PL) + (PR) + (PRL) + (RPR) + (RPLR)$, la

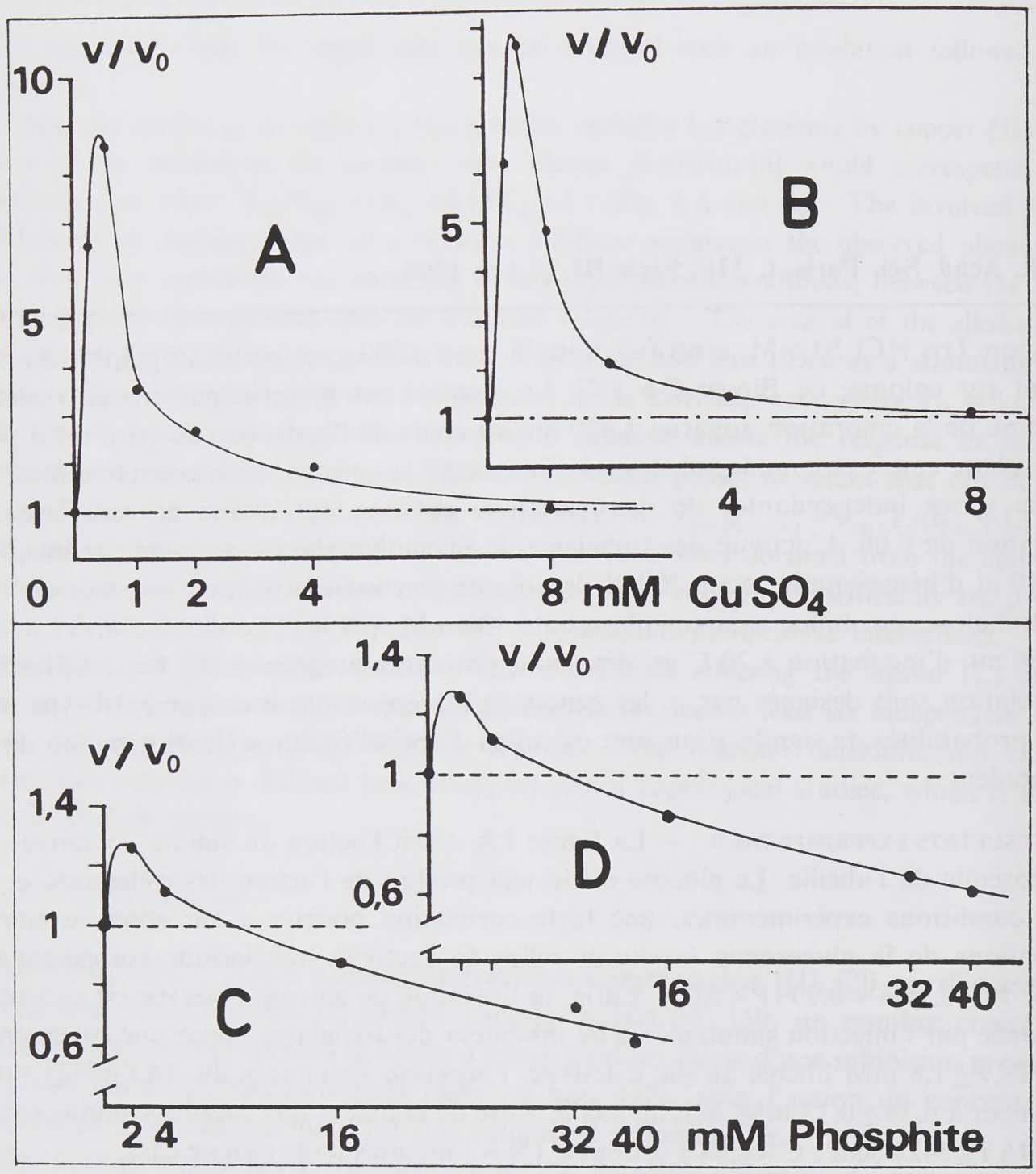


Fig. 1. — Relations biphasiques expérimentales et théoriques : A, variations de la glucosémie relative de l'abeille en fonction des concentrations en $CuSO_4$; B, courbe obtenue par l'équation (4) avec : $V_{M_0}=1,5$, $V_{M_A}=100$, $V_{M_i}=1,05$, $K_L=0,5$, $K_A=0,25$, $K'_A=0,5$, $K_i=2$, $K'_i=0,05$ et $n_R=2$ (asymptote : $v_R \to v_0=1$). Les valeurs théoriques et expérimentales sont en étroite corrélation : $\rho=0,978$ ($N=7$), $P=0,0001$, $b=0,93\pm0,09$; C, variations de l'activité relative des phosphatases du poivron en fonction des concentrations en phosphite; D, courbe obtenue avec : $V_{M_0}=2$, $V_{M_A}=3,4$, $V_{M_i}=0$, $K_L=1$, $K'_A=1$, $K_A=1$, $K_i=10$, $K'_i=10$ et $n_R=0,8$ (asymptote : $v_R \to 0$). Les valeurs théoriques et expérimentales sont en étroite corrélation : $\rho=0,993$ ($N=6$), $P<10^{-4}$, $b=0,95\pm0,06$.

Fig. 1. — Experimental and theoretical biphasic relations: A, variations of the relative glucosemia of honeybees versus $CuSO_4$ concentrations; B, curve obtained from equation (4) with: $V_{M_0}=1.5$, $V_{M_A}=100$, $V_{M_i}=1.05$ $K_L=0.5$, $K_A=0.25$, $K'_A=0.5$, $K_i=2$, $K'_i=0.05$ and $n_R=2$ (*asymptote:* $v_R \to v_0=1$). *Theoretical and experimental values are closely correlated:* $\rho=0.978$ ($N=7$); $P=0.0001$; $b=0.93\pm0.09$; C, *variations of relative activities of pepper phosphatases versus phosphite concentrations. D, curve obtained with:* $V_{M_0}=2$, $V_{M_A}=3.4$, $V_{M_i}=0$, $K_L=1$, $K'_A=1$, $K_A=1$, $K_i=10$, $K'_i=10$ and $n_R=0.8$ (*asymptote:* $v_R \to 0$). *Theoretical and experimental values are closely correlated:* $\rho=0.993$ ($N=6$), $P<10^{-4}$, $b=0.95\pm0.06$.

réponse résultante est donnée par la relation :

$$v_R = U_0 . L/(h_0+L) + U_A . L/(h_A+L) + U_i . L/(h_i+L) \quad (4)$$

dans laquelle U et h sont les réponses maximales et les constantes apparentes, soit :

$$U_0 = V_{M_0}/[1+(R/K'_A)(1+R/K'_i)] \quad (4\text{-}1)$$

63

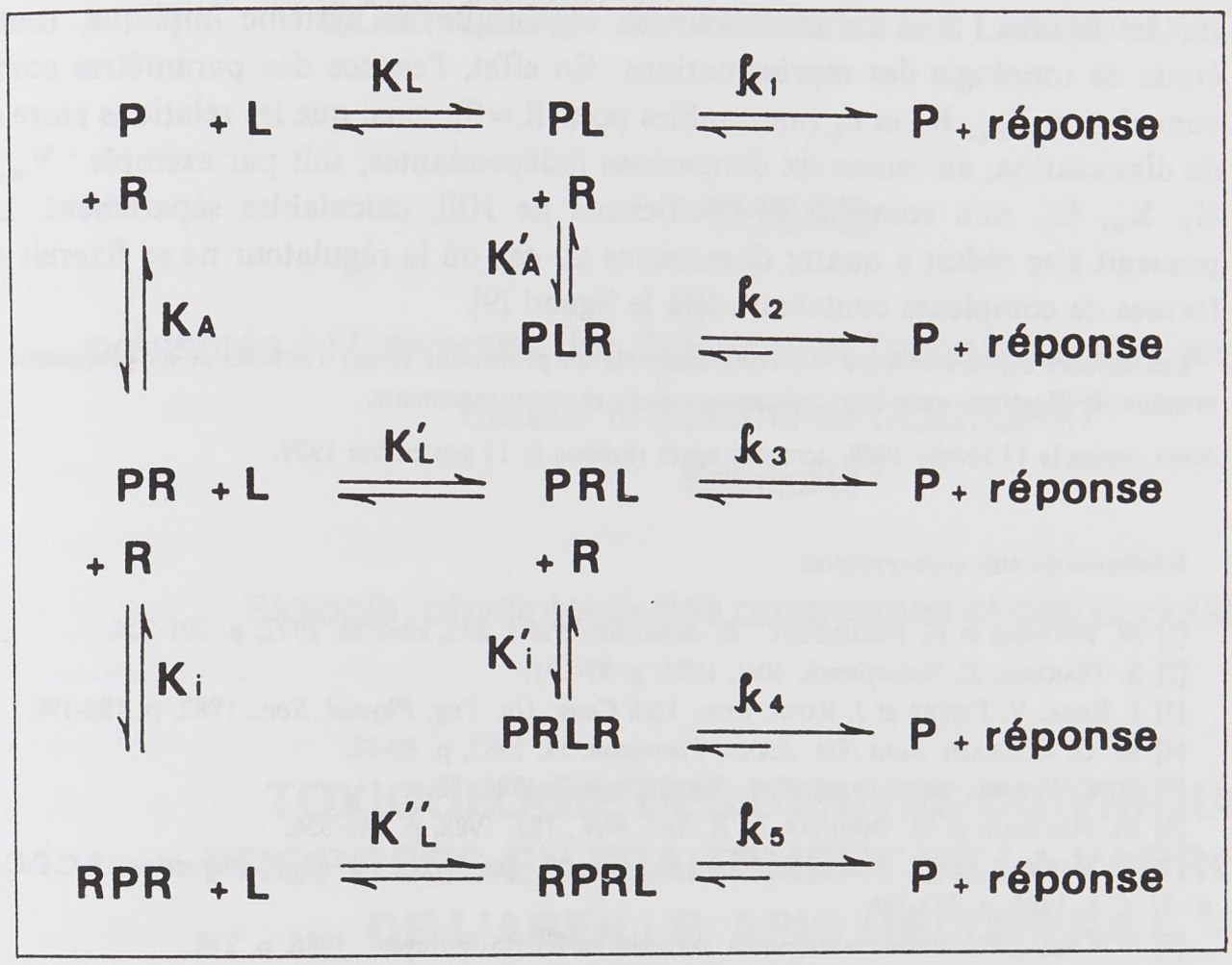


Fig. 2. — Schéma d'interactions moléculaires conduisant à une réponse biphasique.
K désigne une constante de dissociation et k une constante cinétique. P = récepteur; L = ligand; R = régulateur.

Fig. 2. — Molecular interactions resulting in a biphasic response.
K are dissociation constants and k kinetic constants. P = receptor; L = ligand; R = regulator.

(4-2) $$h_0 = K_L (1 + R/K_A)(1 + R/K_i)/[1 + (R/K'_A)(1 + R/K'_i)$$

(4-3) $$U_A = V_{M_A}/[1 + K'_A/R + R/K'_i]$$

(4-4) $$h_A = K_L \cdot K'_A [1/R + (1/K_A)(1 + R/K_i)/(1 + K'_A/R + R/K'_i)$$

(4-5) $$U_i = V_{M_i}/[1 + K'_i/R)(1 + K'_A/R)]$$

(4-6) $$h_i = K_L (K'_i/K_i + [1 + K_A/R] K'_i/R) K'_A/K_A (1 + [1 + K'_A/R] K'_i/R)$$

Les expressions h_0, h_A et h_i sont algébriquement identiques et $h_0 = K_L$ si $K_A = K'_A$ et $K_i = K'_i$. La réponse tend asymptotiquement vers une limite définie par l'expression suivante :

(5) $$v_{\lim (R \to \infty)} = V_{Mi} \cdot L/(K''_L + L).$$

L'équation peut être généralisée, en outre, au cas où (L) et (R) seraient affectés de leurs coefficients de Hill respectifs n_L et $n_R \neq 1$. La réponse des tréhalases pourrait correspondre au cas particulier où, lorsque $R \to O$, $v_R \to v_0$, c'est-à-dire :

(6) $$V_{M_i}/V_{M_0} = (K''_L + L)/(K_L + L).$$

La réponse des phosphatases paraît, au contraire, correspondre au cas particulier où $V_{M_i} = 0$. Dans l'éventualité où le cuivre agirait non pas sur l'enzyme mais sur un hypothétique inhibiteur associé à l'enzyme, celui-ci devrait interagir avec le cuivre selon un mécanisme du même type que celui qui a été proposé.

64

Les paramètres obtenus dans ces deux cas d'après un calcul provisoire sont présentés sur les figures 1 B et D. La résolution algébrique du système implique, toutefois, une étude de topologie des représentations. En effet, l'espace des paramètres comporte, ici, connaissant V_{M_0}, K_L et n_L (mesurables pour $R = 0$), ainsi que les relations entre constantes de dissociation, au moins six dimensions indépendantes, soit par exemple : V_{M_A}, V_{M_i}, K_A, K_i, K'_A, K'_i, non compris les coefficients de Hill, calculables séparément. Le système pourrait être réduit à quatre dimensions au cas où le régulateur ne se fixerait que sur les formes de complexes contenant déjà le ligand [9].

Les auteurs expriment leurs vifs remerciements au professeur Henri Pacheco et au professeur René Thom, membre de l'Institut, pour leurs précieux conseils et encouragements.

Note remise le 13 février 1989, acceptée après révision le 13 septembre 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] M. BOUNIAS et H. PACHECO, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, série D, 1972, p. 201-204.

[2] S. TSAKIRIS, *Z. Naturforsch*, 40/c, 1985, p. 97-101.

[3] J. ROSA, V. FISTER et J. ROSA, *Proc. 12th Cong. Un. Yug. Physiol. Soc.*, 1982, p. 188-190.

[4] M. G. CORRADI, *Acta Nat. Ateneo Parmense*, 19, 1983, p. 89-92.

[5] D. C. YOUNG, *Braz. Petido P. I.*, BR 8601, 867, 1986, 52 p.

[6] M. NECTOUX et M. BOUNIAS, *C. R. Soc. Biol.*, 182, 1988, p. 545-556.

[7] R. LORIENT et M. BOUNIAS, *Proc. Int. Congr.: Fungicides for Crop Protection*, B.C.P.C. Monograph n° 31, C-8, 1985, p. 293-296.

[8] T. KELETI, *Basic Enzyme Kinetics*, Akadémiai Kiado-Budapest, 1986, p. 278.

[9] M. BOUNIAS, dépôt sous pli cacheté n° 16411, Acad. Sci., 1987.

M. B. et M. N. : *Laboratoire de Biochimie, Université d'Avignon/I.N.R.A.*, B.P. n° 91, 84140 *Montfavet;*

R. L. : *Laboratoire de Physiologie et Pathologie végétales, Université d'Avignon*, 33, *rue Pasteur*, 84000 *Avignon.*

3e a

65

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER (MONTPELLIER II)
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir le diplôme de DOCTORAT
Spécialité :

Biologie, physiologie des organismes et des populations

TOXICOLOGIE DES DERIVES CUIVRIQUES PROPOSES EN TRAITEMENT DE LA VARROOSE DE L'ABEILLE, APIS MELLIFERA L.

par

Myriam NAVONE-NECTOUX

Soutenue le 31 Mai 1990 devant le Jury composé de :

MM. EUZET L.	Président
VAGO C.	Rapporteur
BOUNIAS M.	Rapporteur
BERGOIN M.	Examinateur
FEBVAY G.	Examinateur

Résumé

L'administration aux abeilles de dérivés cuivriques, tels que le sulfate ou le gluconate de cuivre, par voie systémique, paraît être efficace contre l'infestation des ruches par *Varroa jacobsoni* Oud. L'effet létal de ces substances est mesuré sur la vie entière d'un échantillon d'abeilles maintenues en cagette, selon de nouveaux concepts toxicologiques : le TL_{50} ou temps de demi-vie des abeilles permet de déterminer une dT_{50} ou dose diminuant de 50% le TL_{50} d'un échantillon d'abeilles témoins nourries au sirop de sucre ; les variations en fonction des doses du coefficient de Hill du facteur temps, n_t (caractérisant la sigmoïdicité des courbes de mortalité), et la vitesse maximale de mortalité, en %/jour, des abeilles au cours de leur vie ont également été examinés. D'après ces critères, le gluconate et l'isoleucinate de cuivre semblent se révéler exempts de toxicité létale aux concentrations testées. L' étude de la vitesse d'absorption de sirops médicamenteux ne montre aucun effet antiappétent de la part du gluconate de cuivre et les abeilles semblent stocker le cuivre jusqu'à un certain seuil où un équilibre s'établit entre cuivre absorbé et cuivre excrété. Enfin, les études biochimiques portant sur la glycémie, les tréhalases et les phosphatases de l'abeille, n'ont mis en évidence que de faibles modifications, momentanées, ne semblant pas porter préjudice à l'insecte, aux doses testées qui représentent des quantités élevées pour des abeilles traitées par voie systémique.

Mots clés : abeille, *Varroa jacobsoni*, cuivre, toxicologie, létalité, glycémie, tréhalase, phosphatase.

67

SOMMAIRE

INTRODUCTION 15

MATERIEL ET METHODES 22

I - Matériel biologique 23

1 - Les abeilles 23
2 - Le rucher 23
3 - Elevage au laboratoire 24

II - Intoxication par nourrissement 27

1 - Nourrissements 27
2 - Mesure de la mortalité 27
a - Nourrissement en continu 27
b - Nourrissement intensif sur 24 h 28
3 - Mesure de l'appétence 28

III - Evaluation de la toxicité par injection 29

1 - Injections 29
2 - Prélèvements d'hémolymphe 29
3 - Prélèvements d'intestin 31

68

IV - Méthode de microanalyse biochimique quantitative par chromatographie sur couche mince 32

1 - Principe 32
2 - Plaques 32
3 - Etalons et échantillons 32
a - Dosage des glucides 33
b - Dosage des lipides 33
4 - Migrations 33
a - Dosage des glucides 34
b - Dosage des lipides 34
5 - Révélations 36
a - Les glucides 36
b - Les lipides 36

V - Lecture de la plaque 36

1 - Principe 36
2 - Longueur d'onde 37
3 - Analyse qualitative 37
4 - Analyse quantitative 37

VI - Action du cuivre au niveau du rucher 38

VII - Dosage du cuivre 38

1 - Echantillons 38
2 - Dosages 39

VIII - Enzymologie 40

69

1 - Les tréhalases 40
a - *In vivo* 40
b - *In vitro* 40
* Extrait brut 40
* Extrait purifié 41
2 - Les phosphatases 41
a - Les phosphatases alcalines 42
b - Les phosphatases acides 42

IX - Méthodes statistiques employées 44

1 - Comparaison de moyennes 44
2 - Corrélations et régression 45
3 - Analyse de variance 46

RESULTATS ET DISCUSSION 47

I - Recherche d'une substance active contre *Varroa jacobsoni* 48

1 - Le cuivre chez *Varroa jacobsoni* et chez *Apis mellifera* 48
2 - Les chélateurs du cuivre 49
3 - Le cuivre 51

II - Action du cuivre au rucher 54

1 - Action du sulfate cuivrique 57
- Article I 57
- Discussion 70
2 - Action du gluconate de cuivre 74
a - Efficacité sur *Varroa jacobsoni* 74
b - Influence de la quantité de couvain 75
c - Toxicité vis-à-vis des abeilles 77

d - Résidus de cuivre dans le miel 78

3 - Conclusion 79

III - Evaluation de la toxicité du cuivre vis-à-vis des abeilles en laboratoire 82

1 - Le sulfate de cuivre 84

- Article II 84

- Discussion 97

2 - Le gluconate de cuivre 99

a - Sans apport protéique 99

b - Avec apport protéique 106

c - Détermination de la DL_{50} par la méthode officielle 111

3 - Autres substances cuivriques 115

a - L'aspartate de cuivre 115

b - L'isoleucinate de cuivre 120

4 - Conclusion 127

IV - Devenir du cuivre chez l'abeille 130

1 - A court terme 130

a - Sulfate de cuivre 130

b - Gluconate de cuivre 132

* Sans apport protéique 134

2 - A long terme 137

a - Sulfate de cuivre 137

b - Gluconate de cuivre 139

3 - Conclusion 141

V - Appétence des différentes substances cuivriques testées vis-à-vis des abeilles 143

1 - Sulfate et gluconate de cuivre 143

a - En l'absence d'apport protéique 143

b - En présence d'apport protéique 145

c - Discussion 147
2 - Aspartate et isoleucinate de cuivre 147
3 - Autres substances cuivriques 148
4 - Conclusion 151

VI - Evaluation de la toxicité du cuivre par injection 154

1 - Action du cuivre sur les glucides 154
a - Le sulfate de cuivre 156
b - Le gluconate de cuivre 161
c - Discussion 166
2 - Action du cuivre sur les lipides 168
3 - Conclusion 170

VII - Impact du cuivre sur quelques cinétiques enzymatiques de l'organisme de l'abeille 172

1 - Les tréhalases 172
a - *In vivo* 172
* Activité tréhalasique 172
* Inhibition des α-glucosidases 176
b - *In vitro* 179
* Activité tréhalasique de l'hémolymphe brute 181
* Activité des tréhalases prépurifiées de l'hémolymphe 181
c - Discussion 185
2 - Les phosphatases alcalines 189
a - Mise au point de la méthode 189
b - Expérimentations 189
3 - Les phosphatases acides 207
4 - Conclusion 215

CONCLUSION GENERALE 217

3.b

73

Journal of Apicultural Research 28(4) : 201–207 (1989)

EVALUATION OF CUPRIC SULPHATE AS AN ACARICIDE AGAINST *VARROA JACOBSONI* O.

GEORGES GUIRAUD, MYRIAM NECTOUX, JEAN-FRANCOIS ANDRE[1], MICHEL BOUNIAS AND DRAGUTIN POPESKOVIĆ[2]

Laboratory of Biochemistry, University and INRA-Avignon, B.P. 91, F84140 Montfavet; [1]Union of Puy-de-Dôme beekeepers, F63610 Besse et St-Anastaise, France; [2]Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Beograd, Bul. JNA, Y1100 Beograd, Yugoslavia

Revised typescript received for publication 17 June 1989

Summary

Field trials on hives showed that cupric sulphate mixed at 0·25–1 g/l with sucrose syrup yielded significant control (>70% mortality) of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni*, in low or moderately infested areas, in spring-, autumn- and winter-feeding treatments. Pure sucrose may also exhibit a light effect (15–29% mortality). Syrups are freely ingested up to 0·35 g/l and the uptake decreases at 0·5–1 g/l, with no uptake observed at higher concentrations. Only slight bee mortality (<0·1%) is observed at 1 g/l (low volumes) or at 0·5 g/l (large volumes). Copper residues in honey never significantly increased from natural levels, following total uptakes of up to 3g per hive, within 1 to 7 months delay.

Introduction

The haemophagous mite, *Varroa jacobsoni* O., was discovered in eastern Europe in 1972 (Haragsim & Samsinak) and has progressively reached all the western parts of the continent and South America (Ritter & De Jong, 1984). The reproduction and infestation rate of the parasite on *Apis mellifera* is particularly high (Ifanditis, 1983; Schultz, 1984) and various treatments have been employed with unequal success (Marchetti & Barbattini, 1984). Moreover, the employment of synthetic pesticides involves the risk of toxicity for bees (Rhodes et al., 1979; Wilkaniec, 1980; Takeuci et al., 1980; Rouas, 1987), and of pesticide residue accumulation in honey (Yaroshenko & Alekseenko, 1977). Finally, the reproduction rate of the parasite and the many possibilities of close breeding between mothers and sons, or brothers and sisters, magnifies the capability of this arachnid to develop resistant strains, particularly to those presticides which can be hydrolyzed, oxidized or conjugated by xenobiotic-metabolizing enzymes (Sawicki & Denholm, 1984).

Popesković (1984) discussed the hypothesis that *Varroa Jacobsoni*, belonging to the chelicerates, might have haemocyanin-like copper-proteins, in contrast with the host. Experiments on the comparative mineral composition of the parasite and the host revealed that the parasite body did contain higher amounts of copper than the bee (Popesković & Pantic, 1984). Then, it appeared that copper-trapping compounds, as well as an excess of copper itself, given to bees by feeding, were able to kill *Varroa* specifically, through a systemic action (Popesković, et al., 1984; Popesković & Bounias, 1986).

In a first step, preceding the study of new generations of compounds, it appeared of interest to determine the actual efficacy of cupric sulphate in field assays. Also of importance was its acceptance by honeybees colonies, its toxicity to bees and its concentration in honey, following hive treatments. Although cupric sulphate appears to be a rudimentary means of attacking *Varroa*, it is a well distributed and cheap compound, without hazard for beekeepers through handling, and without need for special apparatus, since it can be administered in feeding or drinking media.

Materials and Methods

Cupric sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_20$) was provided by La Cornubia (Bordeaux, France). It was prepared, essentially free of heavy metal traces, according to the Macclesfield process. For the whole study, over 200 observations were made on hives distributed in the Puy-de-Dôme, near Clermont-Ferrand, France. The various individual assays and replications were carried out on various apiaries of 12 hives each, managed by different persons. Most hives were of the Dadant type (12 frames, but a few had 10 frames). Feeders were placed at the top of the hives. The absorbed volumes were estimated daily and the apparent mortality of bees was observed at the

74

feeders and on a 1×1 m area, covered with a cloth, situated on the ground in front of the hives.

Feeding syrups were prepared using 6 kg sucrose and 2 kg honey in 10 litres of water in the spring, and 6 kg sucrose in 4 litres of water in the autumn and winter. Syrup alone was given to controls. In treated hives, cupric sulphate was added to the sucrose syrup with gentle warming and stirring, up to final concentrations ranging from 0·125–8·0 g/l. A 0·25 g/l concentration corresponds to 1 mM.

Honey samples were first collected in the main bodies of the hives, in the storage combs situated immediately by the side of the brood combs, and in the supers, at the harvesting period, i.e. within one month and 6–7 months following autumn treatments. Each sample corresponds to the contents of 50±20 cells. Copper residues were determined by atomic absorption spectrometry, using a Perkin Elmer 420 model equipped with an HGA67 graphite oven. Ten µl of a solution of 1 g honey in 10 or 20 ml water were injected using Gilson's automatic dispensors.

The infestation levels were estimated by treatment of hives with Amitraz®. The exact number of remaining parasites was then determined, in a limited number of test cases, by gassing a whole colony and counting all the *Varroa* present in a hive. Hives were anesthetized then killed using ammonium nitrate followed by diethyl ether.

The significances of correlations and of differences between means were calculated from the equation for Student's *t*-distribution. The Mann–Whitney/Wilcoxon Test was alternatively used when large standard deviations were observed. Correlation coefficients were designated by 'ρ', regression slopes by '*b*', intercepts by '*a*', and the SD of *b* was calculated using the following equation:

$$\sigma b = \pm[(b/\rho)^2 - b^2]/n - 2 \quad (1)$$

where *n* represents the number of pairs of data.

During the described experiments, the average temperatures were 13·6±3·9°C (n=17) at 17.00 h.min in spring, and ranged from a daily minimum of 5·2±3·7°C to a daily maxiumum of 16·9±3·5°C (n=31) in autumn.

Results

Uptake of cupric syrups

Fig. 1A illustrates the various results observed within 48 h. Plotting the total uptake at 48 h *vs.* concentrations of cupric sulphate from 0 to 0·35 g/l did not give rise to significant results: ρ=0·12 (P=0·74); a=5·1; b=0·39±1·11 l²/g (n=12). By contrast, a strong negative correlation is observed from 0·2 to 0·5 g/l: ρ=−0·93 ($P=3{\cdot}6\times10^{-5}$); a=7·9; b=10·1±1·3 l²/g

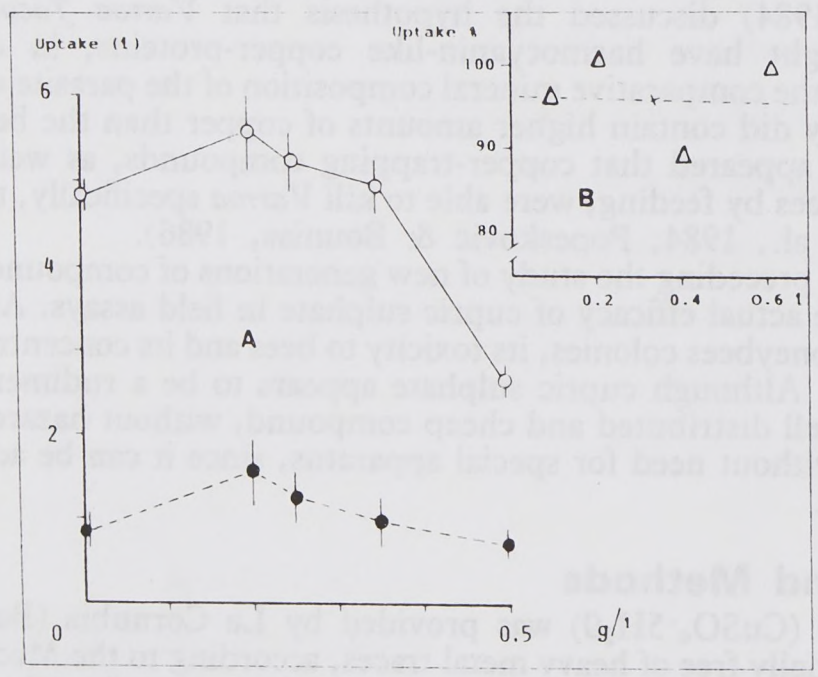


FIG. 1. (A) Uptake of syrup in litres per hive within 8 h (--●--) or 48 h (—○—) in spring, against cupric sulphate concentrations. One SD calculated from 3 independent determinations is indicated by a vertical bar. Six litres were available to each hive. (B) Uptake within 24 h of 1 g/l cupric syrup percentage delivered as 100 ml, repeatedly. No correlation appears with total volumes given (ρ = −0·06).

75

TABLE 1. Observed mortality of bees during treatments at various cupric sulphate concentrations. The uptake was complete, by continuous feeding, within 24 h in spring and 48 h in late summer. n = number of hives.

Period	*Copper concn (g/l)*	*Total uptake (mg/hive)*	n	*Mortality per hive (means ± SD)*
Spring	0·25	25	18	0·0
	0·50	50	18	0·0
	1·00	100	36	18·1 ± 39·4
Late summer	0·20	1200	9	0·0
	0·25	1500	9	0·0
	0·35	2100	9	1·7 ± 2·5
	0·50	1500	9	22·2 ± 37·0[1]

[1]Less than 0·1%.

(n=12). With 1 g/l, the average uptake was 78·7% of the given syrup (n=38) whereas it dropped to zero with 2 g/l (n=25), 4 g/l (n=25) and 8 g/l (n=5). The decrease in the uptake of syrups became significant from O·5 g/l at 48 h ($P<\cdot 0{\cdot}001$). No difference was evident when compared with controls, despite the apparent increase at 0·2 g/l at 48 h (P=0·06), which was not confirmed by laboratory experiments (Nectoux, 1987). Fig. 1B shows that the % uptake is not significantly influenced by the total volume given to the hives.

Mortality of bees

In a total of 108 hives tested, bee mortality was only observed in 9 (8·3%) and only traces of toxicity (less than 5 bees per hive) were observed in 12 others (11·1%). Table 1 gives the results obtained in the spring and at the end of the summer. The mortalities remained insignificant up to 1·5 g per hive at 0·50 g/l, and 0·1 g per hive at 1 g/l ($P>0{\cdot}10$).

Efficacy against *Varroa*

Experiments were carried out at various infestation levels: (*a*) weak or no infestation, (*b*) moderate infestation. The actual number of parasites was determined in cases of moderately infested hives.

TABLE 2. Relative effects of cupric sulphate administered at 3 periods of the year in weakly infested apiaries. M, delay (months) between the treatments and the observations on hives; T, average number of *Varroa* killed per hive during the treatments; C, average number of *Varroa* killed following Amitraz controls; E %, apparent efficacy; Means ± SD are given for (n) hives; I, number of infested hives; ND, not determined.

Period	$CuSO_4$ *concn (g/l)*	$CuSO_4$ *total uptake (g/hive)*	M	n	I	T	C	E %
Spring	0·00	0·00[1]	1	2	2	0·00	2·6 ± 1·4	—
	0·25	0·25	1	3	1	2·7 ± 4·6	0·0	100
	0·50	0·50	1	3	2	8·3 ± 7·4	0·0	100
	1·00	1·00	1	6	1	2·2 ± 5·3	0·0	100
Autumn	0·00	0·0[2]	0·3	3	3	ND	113 ± 51	
	0·20	0·6	0·3	3	3	20·3 ± 3·0	1·0 ± 1·7	96·0
	0·25	1·5	0·3	3	3	31·7 ± 3·8	0·0	88·7
	0·40	2·4	0·3	3	3	28·7 ± 3·5	6·6 ± 6·1	82·3
Winter	0·00	0·00[3]	5	3	3	ND	664 ± 162	—
	0·25	2·5	5	9	1	ND	0·78 ± 2·3	—

[1]1 litre syrup, [2]6 litres syrup, [3]10 litres syrup.

TABLE 3. Action of cupric sulphate feeding on moderately infested hives in autumn (5 l syrup, 1 month observations) and winter (10 l syrup, 5 months observations).
Means ± SD are given for *n* hives; *T*, number of parasites killed during treatments; *C*, number of parasites killed following Amitraz treatments as final controls; *E* %, apparent efficacy relative to Amitraz controls: see Table 4 for exact determinations.

Period	*n*	*Total uptake (g/hive)*	*T*	*C*	*E* %
Autumn	4	0·0	96·7 ± 60·8	187·5 ± 45·8	22·3
	20	1·25	50·3 ± 42·7	43·8 ± 61·5	74·4
Winter	5	0·0	79·6 ± 69·8	69·4 ± 83·8	62·7
	21	2·5	6·2 ± 6·3	0·4 ± 0·9	96·2

Weak or no infestation

Table 2 indicates the results of several experimental assays. The infestation levels were higher in autumn than in spring and winter. In this case, two Amitraz® control treatments were performed at a 1-month interval. No parasites remained at the second treatment, except in 1 hive. The treatment failed to show any significant difference according to administered doses ($P>0{\cdot}30$).

Moderate infestation

Table 3 gives a set of results obtained in autumn and in winter. The apparent efficacy of treatments was significant both in autumn ($P=0{\cdot}002$) and in winter ($P=0{\cdot}05$) relative to controls. It is noteworthy that in untreated hives, the population of parasites had strongly increased by comparison with treated ones. However, it appeared that a rather large number of parasites was killed after administration of pure syrup, with respect to the expected natural mortality rates (Robaux, 1987). In order to check for the reasons for this observation, another set of experiments was made, in which the colonies were gassed at the end of the trials and the actual number of parasites was exactly determined: the results are presented in Table 4. These data indicate that the actual efficacy was reduced when an exact determination of the parasite population remaining in the hives was provided. The variability in cupric-sulphate-treated bees was drastically increased by one hive in which only one parasite fell during treatment whereas 12 remained in the hive. For the remaining 5 hives, the average efficacy was: $E1=97{\cdot}1\pm4{\cdot}3\%$ and $E2=86{\cdot}3\pm8{\cdot}8\%$. In this case, no significant difference was found between $E1$ and $E2$, whereas the non-parametric test gave $\epsilon=2{\cdot}24$ ($P<0{\cdot}02$) when the 6 hives were considered together. In control hives fed pure sucrose, the results differed between hives with or without queens (i.e. in the presence or absence of brood). Without brood, no differences appeared, by contrast with the results obtained in the presence of queens, where the actual efficacy was strongly decreased (by 83%) relative to the apparent efficacy ($P=0{\cdot}025$).

TABLE 4. Verification of the action of sucrose with or without cupric sulphate, on the apparent (1) and actual (2) mortality of *Varroa jacobsoni*, as determined after gassing the hives.
Winter treatments were run over 5 months and 10 l sucrose were given, pure or with added 0·25 g/l cupric sulphate. Means ± SD are given for *n* hives examined; Number of parasites killed are given during treatments (*T*), after Amitraz controls (*C*1), and after gassing colonies (*C*2); *E*1, apparent efficacy; *E*2, actual efficacy.

	Sucrose + cupric sulphate with queens	*Sucrose alone with queens*	*Sucrose alone without queens*
n	6	3	2
T	10·0 ± 7·7	86·0 ± 84·3	70·0 ± 70·7
*C*1	0·5 ± 0·8	23·0 ± 30·6	139·0 ± 100·4
*C*2	3·3 ± 4·4	434·0 ± 353·7	7·5 ± 6·4
*E*1	97·6 ± 4·0	85·3 ± 9·7	29·5 ± 9·6
*E*2	73·2 ± 33·0	14·7 ± 2·0	28·5 ± 9·3
*E*2/*E*1	0·75	0·17	0·97

77

TABLE 5. Copper residues in honey (mg/kg) following treatments with various cupric sulphate concentrations.

Means followed by SD are given for the numbers of determinations in parenthesis (i.e. number of independent samples). *A*, main body of the hive; *B*, super. All data came from treatments in autumn with 5 l administered.

Copper uptake (g/hive)	*< 1 month delay*	*5–7 months delay*	
	A	*A*	*B*
0·00	3·3 (4)2·5	4·1 (3)3·0	—
1·25	4·5(46)3·3	4·3(36)4·6	3·0(15)2·2
2·50	—	1·0(21)0·25	0·8(21)1·0[1]
3·00	—	1·6 (6)1·0	0·6 (6)0·1[2]

Comparison with controls: [1] $P=0{\cdot}09$; [2] $P=0{\cdot}05$.

Copper residues in honey

The results indicated in Table 5 were obtained from hives treated in autumn. No significant increase was observed from basic copper levels observed in untreated hives, nor were any differences found according to the various amounts of cupric sulphate given to the hives.

Discussion

The use of systemic treatments against *Varroa* has been suggested for several years (Moritz et al., 1981). It has been known for a long time (Pershad, 1967) that the age of the workers, their number and the environmental temperature, play a part in the trophallactic distribution of substances in the colony. Maximum rates were obtained with young workers (from 2 to 6 days), and minimum ones at higher temperatures (37°C). This might partly explain the observed differences in treatment efficacy according to the season, with apparently better results in spring, with mild temperature and large numbers of emerging bees. It is noteworthy that the uptake of syrups was reduced by external temperatures lower than 10°C, and increased in the presence of undrawn combs and following the honeydew period. The phagoinhibitory action of cupric sulphate occurs at concentrations giving the first mortality symptoms (above 0·5 g/l) so that autoprotective behavioural effects can be expected.

The toxicity of cupric sulphate to *Varroa jacobsoni* appears strong enough, in the case of low or moderate infestation levels, to prevent the multiplication of the parasite. This is apparently not the case for severely infested hives (>1000 parasites), where the treatment might fail to counteract the high reproduction rate of the mite. In severely infested hives (up to 7000 parasites), copper treatments operated over 1 month revealed a final efficacy variable from 30% (5 hives) to 60% (70 hives). Nevertheless, similar dose-effect relationships obtained in these last cases and in previously described ones (Popesković & Bounias, 1986), confirm that cupric sulphate is toxic to *Varroa jacobsoni*. Recently, laboratory experiments on isolated hives have pointed out positive correlations between the volume uptake and the fall of parasites, indicating short-term effects (Bounias et al., 1988). Copper-protein targets are likely to include haemocyanin-like pigments, as first emphasized by Popesković (1984), but also other enzymic compounds, all involved in respiratory metabolism (Nectoux et al., 1987*a*,*b*).

It is interesting to note that in vertebrates, continuous feeding for 48 h with sucrose elicits an accumulation of lactic acid (Cao et al., 1987) and that sucrose exhibits toxic effects on the respiratory metabolism in mitochondria (Nicholls & Lindberg, 1972). These observations might provide some support for the weak but significant toxic action of pure sucrose syrup on the mite when it feeds on high-sucrose honeybee haemolymph. As a control, similar carbohydrate amounts have been administered as honey (i.e. glucose and fructose, essentially free of sucrose). In this case, no toxic effects were noted against the parasite, since the observed mortality rates were identical to those from untreated hives (28%, $n=2$ hives for each case). In almost all cases, the total number of parasites was much higher in untreated hives. Slowing *Varroa* metabolism and movement may reduce the spread of mite-transmitted viruses (Ball, 1985).

Finally, it is important to note that the bee storage of copper, following treatments, did not

78

exceed the concentrations normally present in honey. This means that well-conducted administration of copper-containing compounds should not alter at all the natural composition of honey, which is an advantage over other drug additives, whose presence in honey is to be expected, according to previous studies on the storage of syrups (Douault et al., 1974). The aim of further research is now to identify the involved biochemical target and the mode of action of the cupric sulphate.

Acknowledgements

This work was partly supported by grants from UNAF, Intermiel-France, and contributions from l'Abeille Héraultaise, Syndicat des Apiculteurs du Vaucluse and Ets. Ickowicz. Thanks are due to Dr. J. F. Perez for allowing copper determinations in his laboratory; to Mr. N. Mallet and numerous others for their participation in field assays.

References

ANDRE, J. F. (1988) Observations du comportement des colonies d'abeilles lors de la constitution des essaims de traitement obtenus par tapotement, dans la lutte contre la varroatose. *Revue fr. Apic.* 472 : 119–122

BALL, B. V. (1985) Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J. apic. Res.* 24 : 115–119

BOUNIAS, M.; NECTOUX, M.; GUIRAUD, G.; CASCINO, P.; POPESKOVIĆ, D. (1988) Les facteurs influençant les traitements par nourrissements (traitements "systémiques"). *Revue fr. Apic.* 470 : 21–22

CAO, G. R.; ENGLISH, P. B.; FILIPPICH, L. J.; INGLIS, S. (1987) Experimentally induced lactic acidosis in the goat. *Aust. vet. J.* 64 : 367–370

DOUAULT; PH.; LOUVEAU, J.; THEURKAUFF, J.; AZOEUF, P.; PINTENA, J. (1974) Etude du stockage des réserves par les abeilles au moyen d'un sirop de sucre marqué au ^{141}Ce. *Apidologie* 5 : 107–126

HARAGSHIM, O.; SAMSINAK, K. (1972) L'acarien *Varroa jacobsoni* Oudemans découvert en Europe. *Bull. apic.* 15 : 147–160

IFANDITIS, M. D. (1983) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *J. apic. Res.* 22 : 200–206

MARCHETTI, S.; BARBATTINI, R. (1984) Comparative effectiveness of treatments used to control *Varroa jacobsoni* OUD. *Apidologie* 15 : 363–378

MORITZ, R. F. A.; KOENIGER, N.; MAUL, V. (1981) La distribution des préparations à action systémique dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifera* L.). *Apiacta* 16 : 57–63

NECTOUX, M.; BOUNIAS, M.; POPESKOVIĆ, D. (1987*a*) Varroase, lutte biochimique. I - Les cibles cuproprotéiques liées au métabolisme respiratoire. *Revue fr. Apic.* 466 : 399–400

———(1987*b*) Varroase, lutte biochimique. II - Antagonistes des métaux intervenant dans le fonctionnement des cofacteurs enzymatiques. *Revue fr. Apic.* 467 : 445–446

NECTOUX, M.; ANDRE, J. F.; GUIRAUD, G.; BOUNIAS, M.; POPESKOVIĆ, D. (1988) Bilan expérimental des potentialités toxiques du sulfate de cuivre dans la lutte contre la varroatose de l'Abeille. *C.r. Séanc. Soc. Biol.* 182 : 466–477

NICHOLLS, D. G.; LINDBERG, O. (1972) Inhibited respiration and ATPase activity of rat liver mitochondria under conditions of matrix condensation. *FEBS Lett.* 25 : 61–64

PERSHAD, S. (1967) Analyse des différents facteurs conditionnant les échanges alimentaires dans une colonie d'abeilles *Apis mellifica* L. au moyen du radio-isotope ^{32}P. *Annls Abeille* 10 : 139–197

POPESKOVIĆ, D. (1984) Species hypocopperemia of honeybee in relation to mite (*Varroa jacobsoni*) as a basis for a new systemic approach to the fight against *Varroa*. *Proc. 3rd int. Symp. Varroa, Split, Yugoslavia* : 33–35

POPESKOVIĆ, D.; ANDRIC, M.; PANTIC, S. (1984) Investigations of the effectiveness of some copper-acceptable compounds intended against mite *Varroa jacobsoni*. *Proc. 3rd int. Symp. Varroa, Split, Yugoslavia* : 30–32

POPESKOVIĆ, D.; BOUNIAS, M. (1986) Le blocage du fonctionnement des hémocyanines de l'acarien *Varroa jacobsoni* comme base physiologique spécifique d'un traitement par voie systémique de la varroatose de l'abeille. *C.r. Séanc. Soc. Biol.* 180 : 662–668

POPESKOVIĆ, D.; PANTIC, S. (1984) Mineral composition of mite *Varroa jacobsoni* and honeybee *Apis mellifica* (some practical implications). *Proc. 3rd int. Symp. Varroa, Split, Yugoslavia* : 36

RHODES, H. A.; WILSON, W. T.; SONNET, P. E.; STONER, A. (1979) Exposure of *Apis mellifera* to bee-collected pollen containing residues of microencapsulated methyl parathion. *Envir. Ent.* 8 : 944–948

RITTER, W.; DE JONG, D. (1984) Reproduction of *Varroa jacobsoni* O. in Europe, the Middle East and tropical South America. *Z. angew. Ent.* 98 : 55–57

ROBAUX, P. (1986) *Varroa* et varroatose. *OPIDA*

ROUAS, G. (1987) Innocuité pour les abeilles du fluvalinate seul ou en mélange avec un fongicide. *Phytoma* 387 : 9

79

SAWICKI, R. M.; DENHOLM, I. (1984) Adaptation of insects to insecticides. *pp.* 152–156 *from* Origins and development of adaptation. *London: Pitman Books*

SCHULTZ, A. E. (1984) Reproduktion und Population-sentwicklung der parasitischen milbe *Varroa jacobsoni* oud. in abhängigkeit vom brutzyklus ihres wirtes *Apis mellifera* L. *Apidologie* 15 : 401–420

TAKEUCI, K.; HIGO, M.; SAKAI, T. (1980) Susceptibility of the honeybee to several insecticides. *Tamagawa Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokuku* 20 : 40–46

WILKANIEC, Z. (1980) Toxicity of some pesticides for bees in laboratory investigations. *Rocz. Akad. Roln. Poznaniu* 120 ; 147–151

YAROSHENKO, V. I.; ALEKSEENKO, F. M. (1977) Determination of phenothiazine in honey. *Visn. Sil's'kogospod. Nauki* 7 : 109–110

N70

SYNERGISTIC AND MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN THE FORMAMIDINE AMITRAZ AND COPPER(II) SULPHATE, USED AGAINST THE MITE *Varroa jacobsoni* O., PARASITE OF THE HONEYBEE *Apis mellifera* L.

Michel BOUNIAS*, Jean Francois ANDRE** and Irena KRUK***

* Laboratory of Biochemistry, University and INRA - Avignon, BP 91, F 84143 Montfavet Cedex, France.

** Syndicat des Apiculteurs du Puy de Dome, F 63610 Besse et St. Anastaise, France.

*** Institute of Physics, Technical University of Szczecin, Al. Piastów 48/49, 70-310 Szczecin, Poland.

S U M M A R Y - Toxicological field-assays have shown that the shock-treatment efficacy of the formamidine pesticide amitraz, used against the parasitic mite *Varroa jacobsoni*, is synergistically improved by the administration of copper(II) ← sulphate through feeding of the honey-bees. Amitraz is autoxidized and this process is accompanied by chemiluminescence (CL). The emission is enhanced in the presence of noradrenaline, chlorophyll-a or H_2O_2. The effect of $^1O_2$-quenchers, free radical reaction inhibitors, catalase and sorbate ion exerted on the light emission was studied. The data indicate cytotoxic oxygen species ($HO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) and electronically excited compounds formation. A dose-related inhibition of CL by copper(II) sulphate was observed suggesting that copper ions might decrease the rate of amitraz oxidation. Such process, occuring in the body of the mite would thus enhance its toxicity, and make a contribution to the observed synergy.

Running title - synergy between copper(II) and amitraz toxicity (to mites).

Key words - Miticides - Copper(II) - Amitraz - Synergy - Autoxidation-Quenching - Oxygen free radicals.

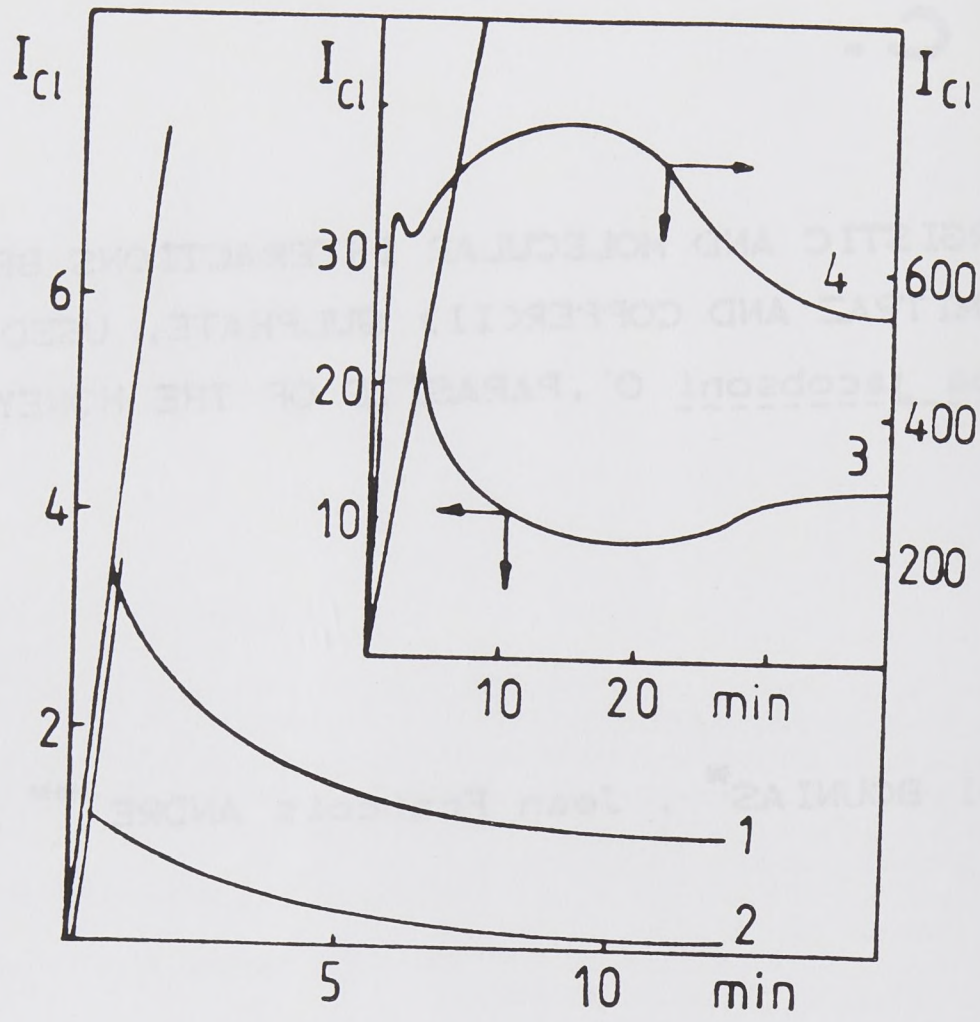


Fig.1. Kinetic curves of chemiluminescence accompanying autoxidation of amitraz. Curves: 1-1mM amitraz dissolved in acetone-water (10/90 V/V) at pH 10.8; 2-control reaction in the absence of amitraz; 3-as 1, but in the presence of 0.1 mM chlorophyll-a; 4-as 1, plus 1 mM H_2O_2.

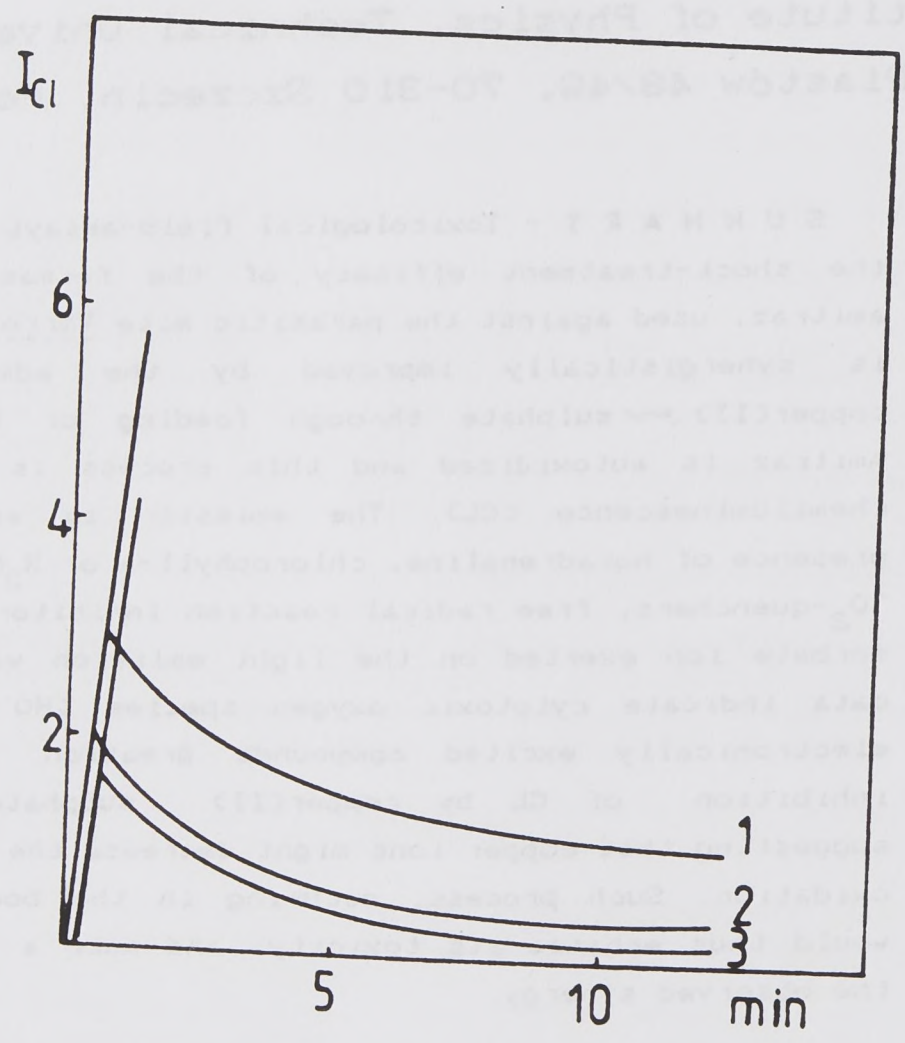


Fig.2. Effect of superoxide dismutase (curve 2) and catalase (curve 3) on the light emission accompanying autoxidation of amitraz (curve 1). Assay conditions as in Fig. 1 curve 1, with 20 $\mu g.ml^{-1}$ superoxide dismutase and 20 $\mu g.ml^{-1}$ catalase.

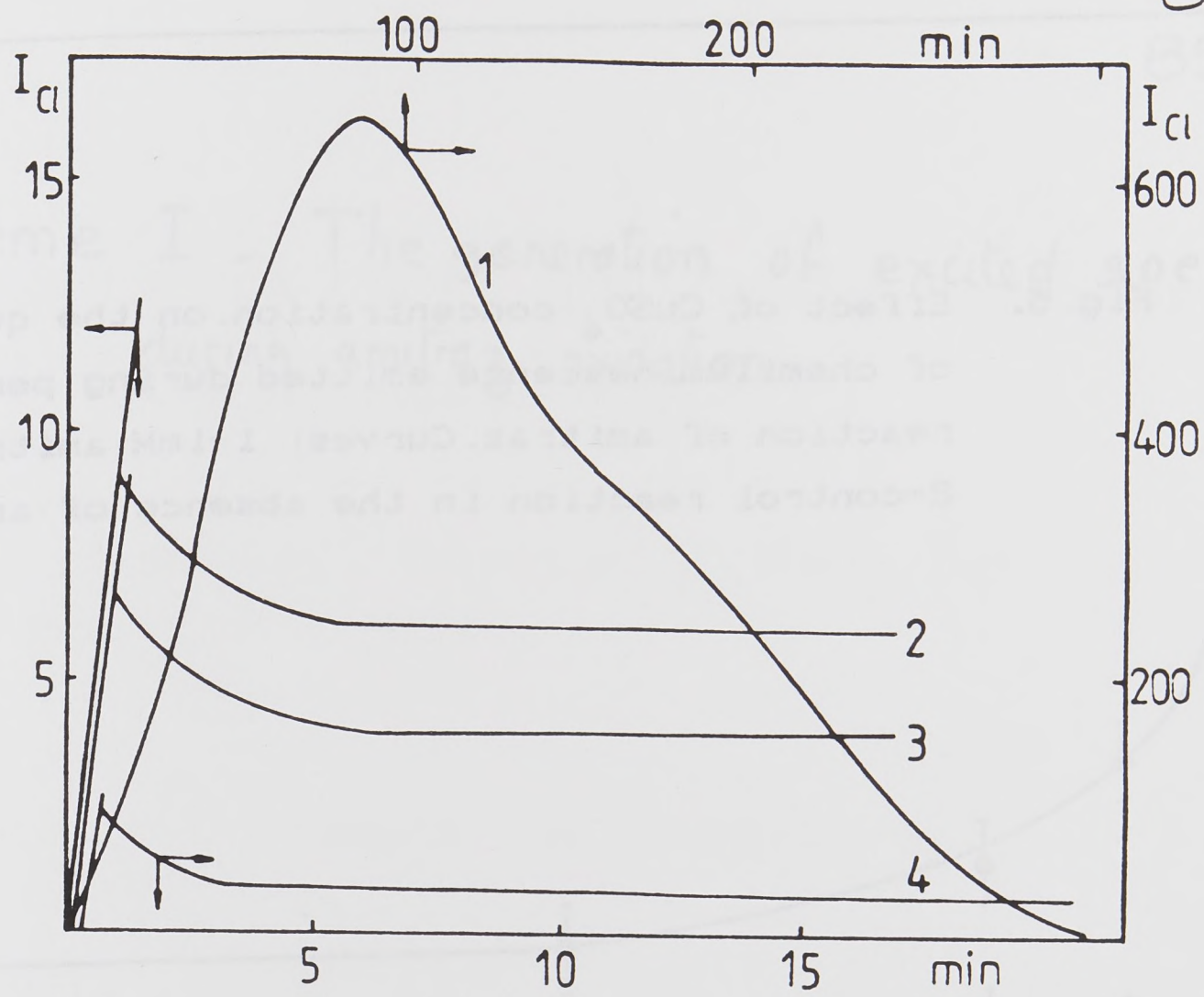


Fig. 3. Effect of noradrenaline on amitraz induced chemiluminescence. Curves: 1-1mM amitraz + 1 mM noradrenaline + 0.05 mM $CuSO_4$; 2-as 1, but without noradrenaline; 3-control reaction without noradrenaline nor amitraz; 4-1 mM noradrenaline + 0.05 mM $CuSO_4$

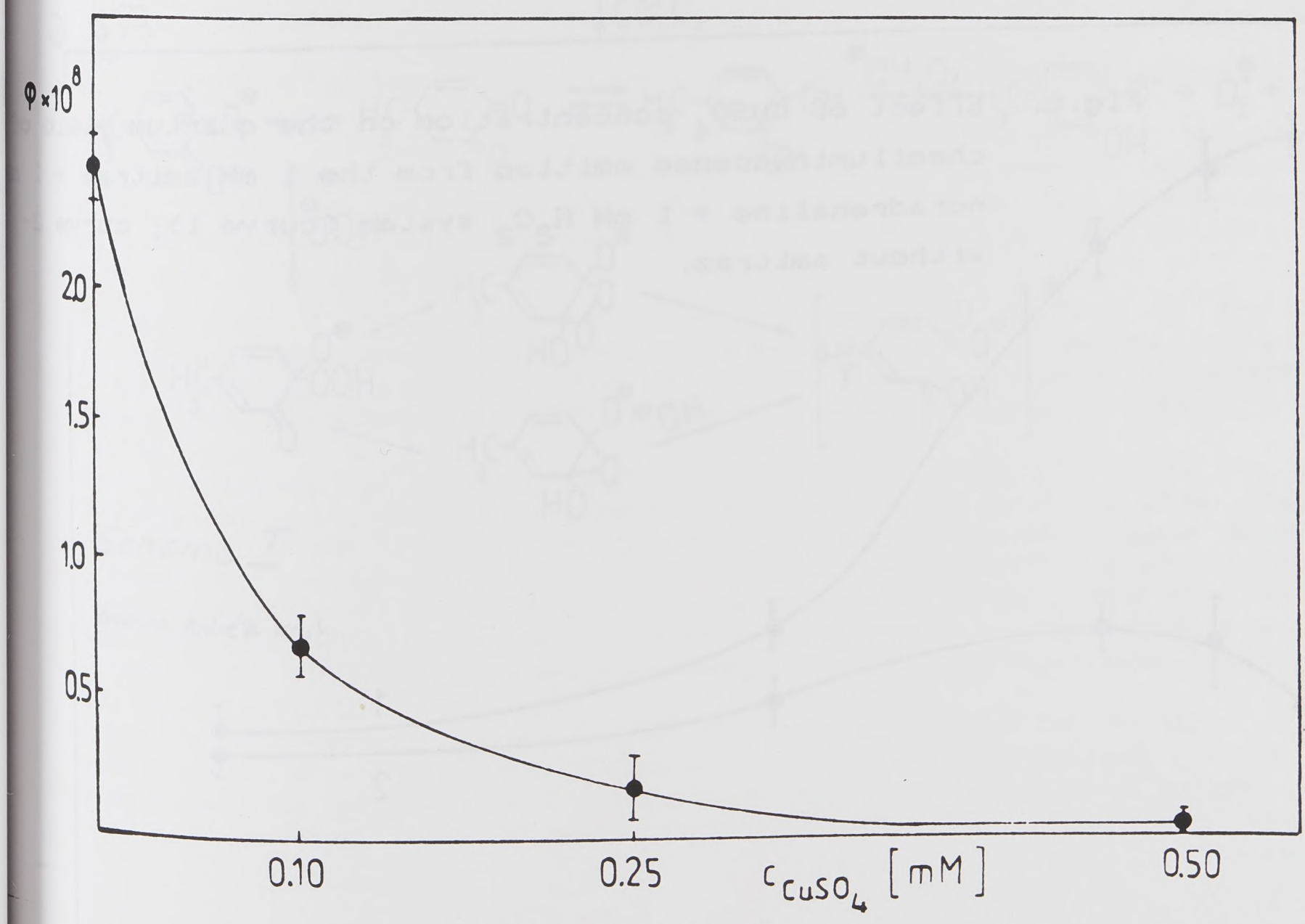


Fig. 4. Effect of $CuSO_4$ concentration on the quantum yield of chemiluminescence from 1 mM amitraz + 1 mM noradrenaline system.

Fig. 5

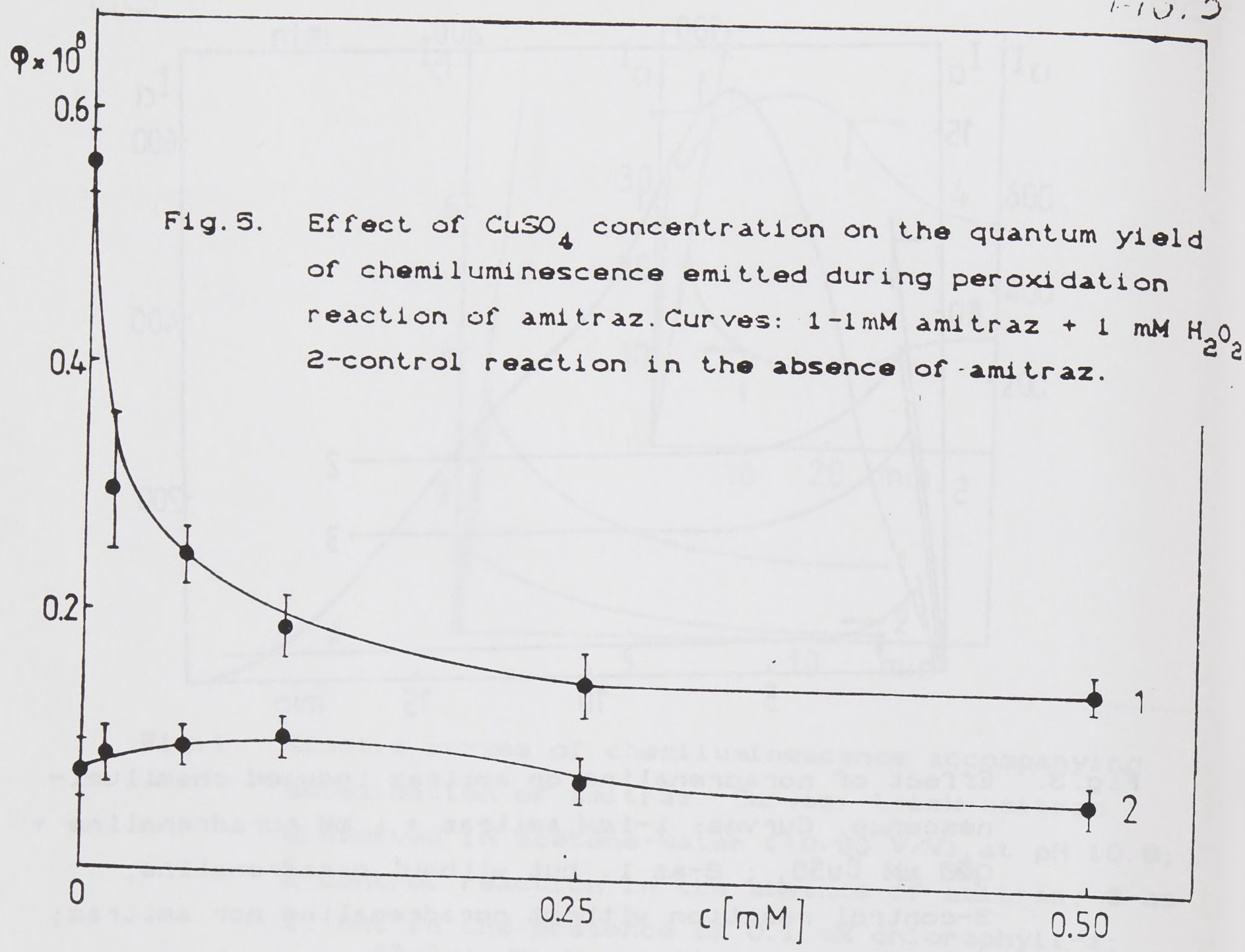


Fig. 5. Effect of $CuSO_4$ concentration on the quantum yield of chemiluminescence emitted during peroxidation reaction of amitraz. Curves: 1-1mM amitraz + 1 mM H_2O_2; 2-control reaction in the absence of amitraz.

Fig. 6

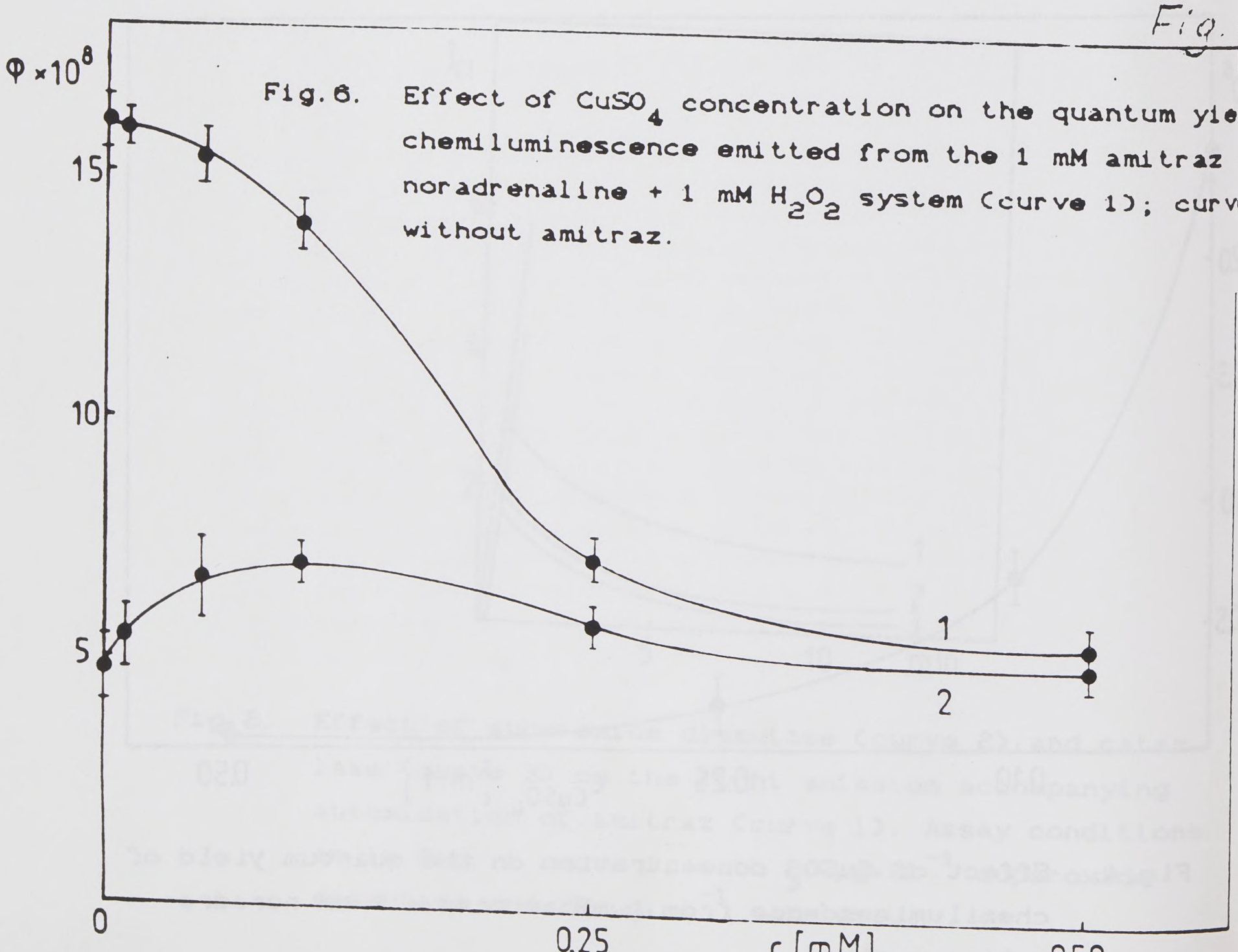
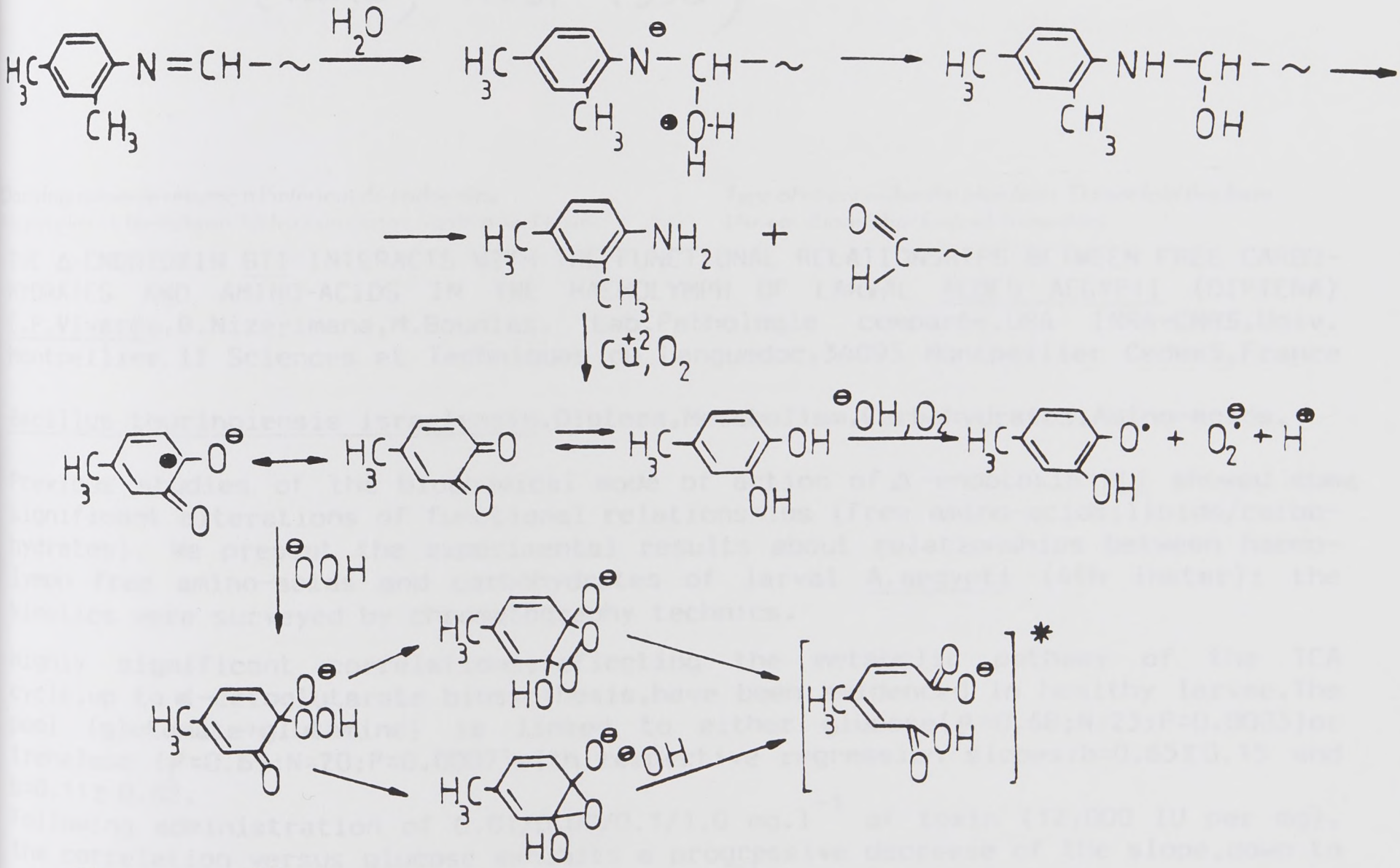


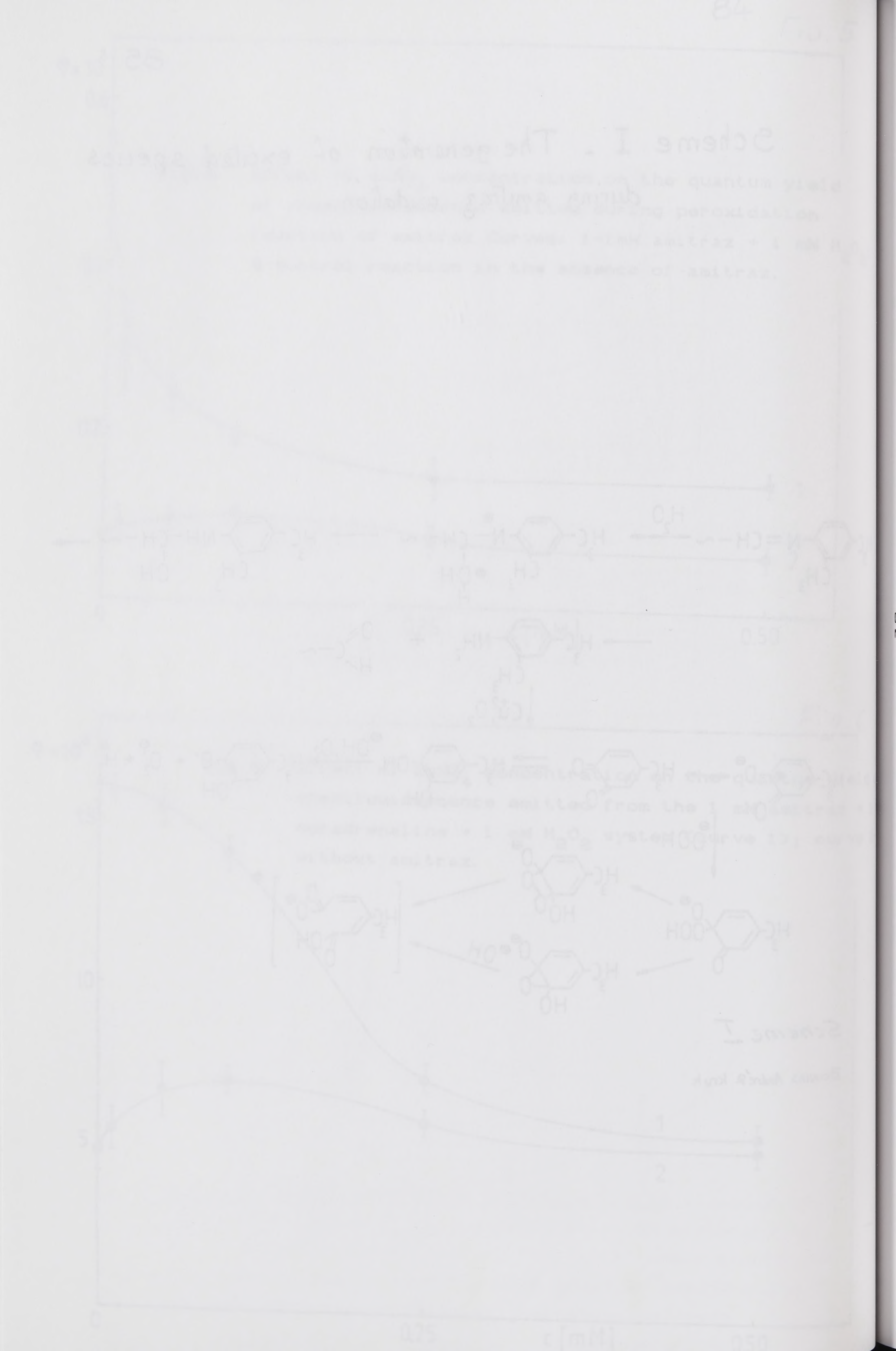
Fig. 6. Effect of $CuSO_4$ concentration on the quantum yield of chemiluminescence emitted from the 1 mM amitraz + 1 noradrenaline + 1 mM H_2O_2 system (curve 1); curve 2 without amitraz.

Scheme I - The generation of excited species during amitraz oxidation



Scheme I

Bouvias André & kruk



C.R.Ann. LBC, 19, 1990

4°

ACTION DE LA TOXINE DU Bacillus thuringiensis chez le moustique Aedes aegypti.

Collaboration avec l'Université de Montpellier
(Professeur C. P. Vivarès)

7e Congrès International de Parasitologie

(Paris, Août 1990)

Dactylographier le résumé à l'intérieur du cadre bleu
Ne pas plier ce formulaire. Utiliser un carton rigide pour l'envoi

Type abstract within the blue lines. Do not fold this form
Use cardboard backing when mailing

THE Δ-ENDOTOXIN Bti INTERACTS WITH THE FUNCTIONAL RELATIONSHIPS BETWEEN FREE CARBOHYDRATES AND AMINO-ACIDS IN THE HAEMOLYMPH OF LARVAL AEDES AEGYPTI (DIPTERA)

C.P.Vivarès, B.Nizeyimana, M.Bounias. Lab.Pathologie comparée, URA INRA-CNRS, Univ. Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 34095 Montpellier Cedex5, France

Bacillus thuringiensis israelensis, Diptera, Metabolism, Carbohydrates, Amino-acids.

Previous studies of the biochemical mode of action of Δ-endotoxin Bti showed some significant alterations of functional relationships (free amino-acids; lipids/carbohydrates). We present the experimental results about relationships between haemolymph free amino-acids and carbohydrates of larval A.aegypti (4th instar); the kinetics were surveyed by chromatography technics.

Highly significant correlations, reflecting the metabolic pathway of the TCA cycle, up to α-cetoglutarate biosynthesis, have been evidenced in healthy larvae. The pool (glutamate+glutamine) is linked to either glucose (ρ=0.68; N=23; P=0.0003) or trehalose (ρ=0.69; N=20; P=0.0007) with respective regression slopes: b=0.65±0.15 and b=0.11±0.02.

Following administration of 0.01/0.02/0.1/1.0 $mg.l^{-1}$ of toxin (12,000 IU per mg), the correlation versus glucose exhibits a progressive decrease of the slope, down to a negative value (b=0.15±0.03) at 0.1 $mg.l^{-1}$ of toxin. Then at maximum dose, the regression slope increases back to a positive value (b=0.46±0.21) not significantly different from the control one. By contrast, the regression slope of the relationships between (glutamate+glutamine) and trehalose remains almost constant from dose zero to 0.1 $mg.l^{-1}$ (B=0.11±0.04), but exhibits a very important increase under the stress of the highest dose (b=0.46±0.21).

The involved metabolic connexions are thus adversely affected by the toxin at low doses, whereas an apparently normal pattern is restored at the highest dose, in the case of glucose. By contrast, the involvement of trehalose seems to be altered only at the highest dose. In both cases, dose/effect relationships are not linear.

Joindre 4 photocopies

5º

89

Journal of Scientific Exploration, Vol. 4, No. 1, pp. 1–18, 1990
Pergamon Press plc. Printed in the USA.

0892-3310/90 $3.00+.00
©1990 Society for Scientific Exploration

Biochemical Traumatology as a Potent Tool for Identifying Actual Stresses Elicited by Unidentified Sources: Evidence for Plant Metabolic Disorders in Correlation With a UFO Landing

MICHEL C. L. BOUNIAS

University and INRA-AVIGNON, Biochemistry Laboratory, B.P. 91, F 84140 Montfavet, France

Abstract—Following an accurate testimony of a "UFO" landing, samples of a wild strain of Alfalfa were collected at the epicentre and at various increasing distances of the trace left on the ground 4 and 40 days after the observation. An additional batch of similar samples collected 730 days after the observation was then used as an a posteriori control of the natural variability on the same area. Biochemical determinations included: photosynthetic pigments, free carbohydrates, and free amino acids. Statistically, significant results were observed by plotting concentrations versus distances from the epicentre, and various characteristic subtypes of dose/effect relationships were evidenced. Functional relationships between photosynthetic pigments, amino acids and carbohydrates, were reversed at $D + 40$ by comparison with $D + 730$ samples which exhibited a normal shape. Thus, the described principles of Biochemical analysis give evidence: (a) that something did happen; (b) that the influence of the unidentified source decreased with increasing distance from the epicentre; (c) of accurate symptoms that can be further compared with those elicited by known causes.

Introduction

One of the most challenging aspects of anomalous phenomenon studies is the question of their reproducibility, which is often considered as a condition for a study to be considered scientific. Another critical aspect in such a study is the validity of human testimonies, which is the object of some specific branches of human sciences and has led to a number of famous controversies in terms of what is science (Abelson, 1974; Bauer, 1979) or what the value of testimonies is (Loftus 1979). [See: Sturrock, 1987, for review in a similar area.]

Nevertheless, there are several scientific domains, undoubtedly accepted as full sciences, that do not actually need any experimental reproducibility. For instance, in paleontology, no one can say when and where the next

Acknowledgements. This work was partly supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales, Toulouse, France (CNES). Thanks are due to Dr. A. Esterle and to Ing. J. J. Velasco (GEPAN) for their assistance in samples collection, to Mrs. M. M. Daurade for technical assistance and to Miss D. Fernandez for typing the manuscript.

90

discovery of an Australopithecus skeleton will occur, although this is never depicted in a joking manner as, for instance, observations (even including material evidence, such as photographs or sonar recordings) concerning the Loch Ness Monster (see Bauer, 1987, for review).

Now the major problem is to record indisputable traces of something that is presently interpreted as an unknown or anomalous event, in view of further classification after more knowledge has been received by the scientific community.

The aim of this paper is to give an example of how to study the effects of a phenomenon of unknown origin (of the UFO-type) on the biochemistry of living nonhuman organisms (i.e., on facts that cannot be suspected of lacking objectivity). The question of comparison with controls arises, and will also be dealt with in this study; despite the fact that one cannot know where and when such phenomena will occur, so that no experimental protocol and planning can be actually organized in view of the comparison of "treated" organisms with untreated ones in as exactly similar conditions as possible.

The particular case that will be analyzed here has been widely reported by French newspapers, radio, and TV as the "Trans-en-Provence UFO landing." A preliminary report on a first set of experiments was published in the CNES/GEPAN Technical Notes (Bounias, 1983a), but major and entirely new aspects of this work had not yet been reported.

Material and Methods

Principles of Sampling Procedure

The first point to be clarified is the exact area where the unknown event (UE) has landed or been in the closest contact with the environment. In the present case, this was the object of a police report referred to as P.V. nr. 28, 9-1-81, relating a visible circular trace on the ground.

Then, an ecological axis should be chosen, along which, a series of plants or sedentary animals belonging to the same species can be found at intervals. This axis should go across the "contact area" of the UE and preferably join the epicentre.

The landing area, visible on the ground, was about 2.5 to 3 m in diameter and plants of a wild strain of alfalfa, *Medicago minima,* were found inside, on the trace, and throughout the surrounding area. This species was thus chosen as the biological model.

The first samples were collected by the local police on the border of the trace (point A) and at a point situated at 20 m (point B) for controls by four days after the observation of the UE.

The second batch of samples (points C to G) were collected by 40 days after the day of observation by a team of technicians of the National Space Research Center. It should be noted that nobody other than the author was aware in advance of when, where, and what was to be collected. This decreases the risk that artifacts could be produced by hoaxers.

A last batch of samples (points H to L) were then collected along the same axis, but two years later, (i.e., in February 1983) the same plant species were growing on the site, but, of course, samples could not be collected at exactly the same distances. Table 1 indicates the position of the various samples along the axis.

Living plants were taken with a large clod of earth and immediately driven to the laboratory and frozen, except sample (A, B), which was transported by policemen in paper sacks.

In sample (A, B), the plants looked rather dry, but without any sign of burning. In all other samples, the alfalfa leaves, of various size, were quite similar in aspect. No visible morphological alteration was discernible after examination under a Meopta DM23 binocular microscope.

Biochemical Procedure

Samples of 100 mg (fresh weight or equivalent) of young leaves (2 to 3 mm with 7.0 ± 3.6 mg average weight by leaf) were ground in Potter homogenizers with chloroform. Older leaves, which were present in samples A and B, were also analyzed. After 5 mn centrifugation at 5,000 g, the lipid phase was recuperated and concentrated under low pressure to a final volume of 5 µl per mg. These extracts were spotted on thin layer plates, and the various pigments (chlorophylls and derivatives, carotenoïds, quinons, and chromenols) separated according to the previously described techniques. Chromatograms were recorded at 425 nm using a CS920 densitometer.

The pellets were resuspended and homogenized in a mixture of water-ethanol-pyridine-acetic acid (80-10-5-5 v/v) for extraction of carbohydrates and free amino acids. Volumes were adjusted to 0.5 µl per mg. Quantitative thin layer chromatographies were performed as previously described for carbohydrates (Bounias, 1976, 1980a) and amino acids (Bounias, 1980b).

The pH of the soil was determined after homogeneization of 5 g of the earth clod in 100 ml water.

TABLE I
Characteristics of the different analyzed samples collected along the ecological axis passing by the epicentre to the trace

Code Letter	Date from Landing (days)	Distance from Epicentre (m)	Classification
A	*D* + 4	1.5	exposed
B	*D* + 15	20.0	control
C	*D* + 40	0.0	exposed
D	*D* + 40	1.5	exposed
E	*D* + 40	2.1	exposed
F	*D* + 40	3.5	exposed
G	*D* + 40	10.0	control
H	*D* + 730	0.5	control
I	*D* + 730	3.8	control
J	*D* + 730	6.0	control
K	*D* + 730	8.8	control
L	*D* + 730	15.4	control

Statistical Methods

Means and *SD* calculated from (N) determinations were used in student's t test for comparisons. Variances were compared using Fisher's F test. The probabilities of significances corresponding to these comparisons and to the correlation and regression (least square method) calculations, were determined from the equations of distribution of t and F. For correlation coefficients (ρ), the "t" value was calculated from: $t = [\gamma \cdot \rho^2/(1 - \rho^2)]^{1/2}$ where ν = degree of freedom = $N - 2$. The standard deviations of the regression slopes (b) was calculated from: $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2)/\upsilon]^{1/2}$ The slopes corresponding to two aleatory variables plotted together are given by $d = b/\rho$.

Additionally, in ($D + 370$) control samples ("H" to "L"), considered as likely representative of the natural biological variability on the site, correlations with distances to the epicentre were artificially increased by switching the values of the two parameters situated at the extreme parts (i.e., H and L) to their upper and lower possible values, (or reversally), taking into account the range of their standard deviation. Then, correlation calculations will give an estimation of what can be considered as the strongest "fortuitous" correlation, in conditions where no particular correlation is expected. The following notations will be used in the text for the regression slopes: b_E for exposed to the event (A to G); b_0 for controls (H to L); b_r for reconstituted theoretical extreme values in controls.

Only the major features will be represented here.

Results

Basic Data

Photosynthetic Pigments. Tables 2, 3, and 4, respectively, give the results obtained in the various samples. It is noteworthy that, in samples A and B, all classes are decreased in exposed samples by an average coefficient which is similar ($p = 0.68$) in both younger (0.60 ± 0.22) and older leaves (0.66

TABLE 2

Photosynthetic pigments in younger and older leaves from exposed (A) and control (B) samples of *Medicago minima*. Means (nmol per mg) ± *SD* are given from $N = 3$ determinations.

Pigments	Younger Leaves		Older Leaves	
	A	B	A	B
Chlorophyll A	0.58 ± 0.13	0.87 ± 0.19	0.54 ± 0.12	0.81 ± 0.18
Chlorophyll B	0.45 ± 0.10	0.62 ± 0.14	0.37 ± 0.10	0.51 ± 0.11
Pheophytins	0.44 ± 0.10	0.73 ± 0.16	0.20 ± 0.05	0.29 ± 0.06
β Caroten	0.09 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.20 ± 0.04
Lutein	0.28 ± 0.06	0.32 ± 0.07	0.24 ± 0.05	0.34 ± 0.08
Violaxanthin	0.03 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.04
Chl.A/Pheo.	1.31	1.19	2.70	2.79

TABLE 3
Photosynthetic pigments in *Medicago minima* leaves in exposed samples. Means (nanomols per mg) ± *SD* are given from duplicate determinations.

Pigments	Samples (distances in meters from epicentre)				
	C(0)	D(1.5)	E(2.1)	F(3.5)	G(10.0)
Chlorophyll A	0.36 ± 0.04	1.10 ± 0.13	1.16 ± 0.14	1.20 ± 0.15	1.30 ± 0.03
Chlorophyll B	0.16 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.02
Pheophytins	0.44 ± 0.06	0.71 ± 0.09	0.77 ± 0.10	0.70 ± 0.09	0.52 ± 0.02
β Caroten	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.22 ± 0.04
Lutein	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.23 ± 0.06
Chl.A/Pheo.	0.82	1.54	1.51	1.71	2.5

± 0.075). These coefficients significantly deviate from 1 in both young (p = 4.81) and old leaves (p = 11.99). In sample C (Table 2), levels are decreased by an average factor C/G = 0.58 relatively to sample G considered as reference. This factor, already significant (N = 5; p = 0.056), drops to 0.48 if chlorophyll B (particularly more stable than chlorophyll A) is discarded (N = 4; p = 0.043). In samples H to L, no statistically significant differences could be found.

Carbohydrates. Tables 5, 6, and 7, respectively, give the results obtained in the three successive batches of samples, for the sole fractions which have been clearly identified in all cases. The most striking result is the observed increase of glucose concentrations in sample C (+158%; p = 0.027) and to a lesser extent in sample D (+32%; p = 0.20) relatively to F or G. By contrast, raffinose and sucrose are depressed in sample C relative to sample G (p = 0.03 and 0.04 respectively). This could not be found in plants sampled at D + 730, which proved to be remarkably homogeneous, all along the axis.

Amino Acids. Tables 8, 9, and 10, respectively, give the concentrations of the identified amino acids in the three series of samples. In the first one, it is

TABLE 4
Photosynthetic pigments in *Medicago minima* leaves in control samples. Means (nanomols per mg) ± *SD* are given from N = 7 determinations.

Pigments	Samples (distances in meters from epicentre)				
	H(0.5)	I(3.8)	J(6.0)	K(8.8)	L(15.4)
Chlorophyll A	0.89 ± 0.42	0.69 ± 0.30	0.69 ± 0.40	0.64 ± 0.20	0.65 ± 0.38
Chlorophyll B	0.45 ± 0.15	0.41 ± 0.10	0.40 ± 0.09	0.40 ± 0.17	0.34 ± 0.17
Pheophytins	1.71 ± 0.54	2.30 ± 0.32	1.83 ± 0.35	1.34 ± 0.26	1.30 ± 0.34
β Caroten	0.37 ± 0.07	0.32 ± 0.08	0.36 ± 0.07	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.07
Lutein	0.72 ± 0.17	0.71 ± 0.19	0.83 ± 0.29	0.62 ± 0.24	0.61 ± 0.15
Chl.A/Pheo	0.52	0.31	0.38	0.48	0.51

TABLE 5
Carbohydrate contents (nmol per mg) in younger and older leaves from exposed (A) and control (B) samples of *Medicago minima*. Means and *SD* are given from duplicate determinations. The total value includes an additional 14 unidentified fractions.

	Younger Leaves		Older Leaves	
	A	B	A	B
Raffinose	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.006	0.1 ± 0.006
Maltose	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.002	0.06 ± 0.004
Sucrose	6.1 ± 1.0	4.4 ± 0.7	3.9 ± 0.6	4.8 ± 0.8
Glucose	1.1 ± 0.08	1.5 ± 0.12	1.5 ± 0.12	2.0 ± 0.16
Fructose	0.9 ± 0.05	2.3 ± 0.11	1.0 ± 0.05	1.4 ± 0.07
Total	18.0	13.5	20.2	25.0

TABLE 6
Carbohydrate contents (nmol per mg) of the leaves of *Medicago minima* in samples C to G. Means and *SD* are given for 2 determinations. Total includes an additional 14 unidentified fractions.

	C	D	E	F	G
Distance from Epicentre (m):	0	1.5	2.1	3.5	10.0
Raffinose	0.13 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.50 ± 0.06	0.50 ± 0.06	0.40 ± 0.05
Maltose	0.4 ± 0.02	1.4 ± 0.06	1.4 ± 0.06	0.8 ± 0.04	0.6 ± 0.03
Sucrose	1.9 ± 0.11	3.3 ± 0.19	5.5 ± 0.33	4.3 ± 0.26	2.9 ± 0.18
Glucose	23.0 ± 2.5	11.6 ± 1.3	9.7 ± 1.0	8.8 ± 0.9	8.9 ± 1.0
Fructose	5.5 ± 0.3	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.0 ± 0.4	7.7 ± 0.5
Total	49.0	34.9	39.0	37.4	32.5

TABLE 7
Carbohydrate contents (nmol per mg) of the leaves of *Medicago minima* in samples H to L. Means and *SD* are given from duplicate determinations. The total includes an additional 17 unidentified fractions.

	H	I	J	K	L
Distance from Epicentre (m):	0.5	3.8	6.0	8.8	15.4
Raffinose	0.04 ± 0.001	0.08 ± 0.003	0.08 ± 0.003	0.21 ± 0.008	0.05 ± 0.002
Maltose	0.2 ± 0.03	0.4 ± 0.06	0.9 ± 0.15	0.6 ± 0.10	0.9 ± 0.14
Sucrose	2.8 ± 0.3	3.1 ± 0.3	4.6 ± 0.6	3.9 ± 0.4	2.6 ± 0.3
Glucose	2.3 ± 0.13	2.3 ± 0.11	3.2 ± 0.18	2.3 ± 0.14	2.6 ± 0.14
Fructose	4.5 ± 0.4	4.9 ± 0.4	6.2 ± 0.5	5.3 ± 0.4	5.8 ± 0.5
Total	23.7	25.8	33.7	29.3	26.9

TABLE 8
Free amino acids content of younger and older leaves of *Medicago minima* in the First series (A and B) of experiments. Means and *SD* (nanomol per mg) are given from duplicate determinations. (*D* + 4/D + 15 fom UE).

	Younger Leaves		Older Leaves	
	B	A	B	A
Distance (m) from Epicentre:	20 m	1.5 m	20 m	1.5 m
Lys	0.02 ± 0.007	0.14 ± 0.05	0.012 ± 0.004	0.25 ± 0.08
Arg	0.30 ± 0.09	0.40 ± 0.12	0.07 ± 0.02	0.17 ± 0.05
His	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.02 ± 0.005	0.07 ± 0.02
Ser	0.45 ± 0.12	0.57 ± 0.15	0.30 ± 0.08	0.20 ± 0.05
Asp	0.04 ± 0.009	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.007
Asn	1.60 ± 0.53	0.74 ± 0.24	0.10 ± 0.03	0.35 ± 0.11
Glu + Gln	0.53 ± 0.05	1.44 ± 0.15	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Thr	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Ala	0.75 ± 0.19	1.70 ± 0.44	1.20 ± 0.31	0.94 ± 0.24
Val	0.80 ± 0.22	0.60 ± 0.17	0.33 ± 0.09	0.29 ± 0.08
Ile	0.24 ± 0.07	0.16 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.04
Leu	0.23 ± 0.11	0.25 ± 0.12	0.14 ± 0.06	0.16 ± 0.08
Phe	0.30 ± 0.06	0.21 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Trp	0.18 ± 0.07	0.31 ± 0.13	0.14 ± 0.06	0.16 ± 0.06
Total*	8.4	10.4	5.2	5.7

* Including an additional 5 unidentified fractions.

TABLE 9
Free amino acids content of *Medicago minima* leaves in the second (C to G) series of samples (*D* + 40 from observation of the UE)

	C	D	E	F	G
Distance (m) from Epicentre:	0.	1.5	2.1	3.5	10.
Lys	0.22 ± 0.015	0.07 ± 0.005	0.08 ± 0.006	0.12 ± 0.008	0.06 ± 0.004
His + Arg	0.40 ± 0.07	0.16 ± 0.03	0.37 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.27 ± 0.05
Ser	0.48 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.02
Asp + Asn	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.25 ± 0.05
Glu + Gln	0.63 ± 0.06	0.87 ± 0.08	1.02 ± 0.09	1.15 ± 0.10	1.10 ± 0.10
Thr	0.16 ± 0.04	0.001 . . .	0.001 . . .	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.03
Ala	0.75 ± 0.08	0.98 ± 0.11	0.68 ± 0.07	1.07 ± 0.11	0.45 ± 0.05
Pro	0.01 ± 0.003	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.19 ± 0.06
Val + Met	0.11 ± 0.03	0.24 ± 0.07	0.34 ± 0.10	0.26 ± 0.08	0.30 ± 0.09
Ile	0.11 ± 0.013	0.12 ± 0.014	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.023	0.20 ± 0.024
Leu	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.05
Phe	0.25 ± 0.06	0.45 ± 0.10	0.39 ± 0.09	0.58 ± 0.13	0.26 ± 0.06
Trp	0.09 ± 0.016	0.17 ± 0.031	0.19 ± 0.034	0.24 ± 0.043	0.11 ± 0.020
Total*	6.3	7.2	8.1	9.8	8.0

* Including an additional 7 unidentified fractions.

TABLE 10
Free amino acids content of *Medicago minima* leaves in the third (H to L) series of samples (*D* + 730 from UE)

	H	I	J	K	L
Distances (m) from Epicentre:	0.5	3.8	6.0	8.8	15.4
Lys	0.14 ± 0.047	0.07 ± 0.024	0.10 ± 0.034	0.05 ± 0.017	0.07 ± 0.024
Arg	0.47 ± 0.052	0.33 ± 0.040	0.23 ± 0.025	0.06 ± 0.007	0.35 ± 0.038
His	0.09 ± 0.020	0.18 ± 0.040	0.12 ± 0.026	0.15 ± 0.033	0.12 ± 0.030
Ser	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.32 ± 0.07
Asp + Asn + Gly	0.54 ± 0.09	1.01 ± 0.18	0.91 ± 0.16	0.77 ± 0.14	0.82 ± 0.15
Gl + Gln	0.45 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.70 ± 0.08	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05
Thr	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.04
Ala	0.43 ± 0.13	0.49 ± 0.15	0.54 ± 0.17	0.53 ± 0.17	0.36 ± 0.11
Pro	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.42 ± 0.13	0.32 ± 0.09
Val	0.25 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.02
Ile	0.07 ± 0.012	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.024	0.10 ± 0.02
Leu	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Phe	0.15 ± 0.04	0.24 ± 0.06	0.31 ± 0.08	0.20 ± 0.04	0.25 ± 0.05
Trp	0.21 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.36 ± 0.08	0.29 ± 0.06	0.23 ± 0.05

noteworthy that lysine (Lys) is increased in both younger and older leaves from plants sampled near the epicentre (A), but with low significance (p = 0.097 and 0.067 respectively). In the second series (D + 40), Lysine again appears as more concentrated at the epicentre, point (C), by contrast with proline (Pro) and isoleucine (Ile), whose concentrations increase with increasing distances from the epicentre. Lysine concentrations are significantly different between C and D (p = 0.009) and C and G (p = 0.007). Proline is depressed in sample C relative to samples D–E (p = 0.06), F (p = 0.07), and G (p = 0.05). Isoleucine is slightly depressed in sample C versus samples F (p = 0.09) and G (p = 0.075). No such differences could be found in samples from the last series (D + 730 from UE).

Incidence of Time-Proximity to the UE on the Biochemical Variability

The homogeneity of the distribution of biochemical parameters along the ecological axis may have been altered by an external factor. The variances calculated for the five samples at D + 40 and D + 730, respectively, have been compared by the "F" test. Significant differences have been noticed in the following 8 cases:

Chlorophyll A:	F = 8.5	$P(F)$ = 0.03
Chlorophyll A/Pheophytin:	F = 48.6	$P(F)$ = 0.001
Lutein:	F = 11.5	$P(F)$ = 0.02
Glucose:	F = 9.3	$P(F)$ = 0.03

97

Ribose-like*:	$F = 13.9$	$P(F) = 0.01$
Rhamnose-like*:	$F = 9.5$	$P(F) = 0.025$
Nr.14:	$F = 23.1$	$P(F) = 0.005$
Digitoxose-like*:	$F = 43.9$	$P(F) = 0.0015$
Nr.17:	$F = 42.3$	$P(F) = 0.0016$
Threonine:	$F = 54.8$	$P(F) < 0.001$

It is noteworthy that all of the four classes of biochemical compounds exhibit some differences corresponding to a significant increase of the variability at $D + 40$ by comparison with $D + 730$ samples.

Correlations With Distances: Various Kinds of Dose/Effect Relationships

Linear Correlations and Regressions. Plotting the concentrations versus distances from the epicentre of the UE gives rise to significant correlations. In all these cases, the slopes of the regression lines (bE) and (bo) corresponding respectively to $(D + 40)$ and $(D + 730)$ samples have been compared. In order to strengthen the significance of these comparisons, tests have also been performed versus the slopes at $(D + 730)$ artificially increased by switching the extreme values (i.e., H and L) to their respectively minimum and maximum values, within the limits allowed by their SD (br).

The main results are summarized in Table 11. The most striking differences appear in photosynthetic pigments, which exhibit the largest susceptibility to the phenomenon.

However, a more accurate analysis of the observed relationships revealed some particular features that will now be examined.

Singular Aspects of Dose/Effect Relationships. The particular aspects concerning glucose, raffinose, ribose-like fraction, threonine, and serine demonstrate interesting features in dose/effect relationships.

Since no direct evidence of traumatism by contact (such as burning, charring, or visible damage on leaves) could be found, and some of the major alterations occurred in the samples situated nearer the epicentre of the UE, this may suggest the hypothesis that the observed effects are due to an energy source whose effects would decrease as a reverse function of distance (i.e., a radiative source).

The case of glucose is illustrated by Figure 1; the natural plot (Figure 1A) suggests a hyperbolic curve. If Ro is the response at $d = 0$ and Ri at di, the difference $\Delta R = Ro\text{-}R$ algebraically behaves as the velocity of an enzyme, (Bounias, 1979) according to the general equation

$$Ri = R_{Max} \cdot di^n/(L + di^n). \quad (1)$$

* Unidentified fractions of similar chromatographic mobilities as the indicated standards.

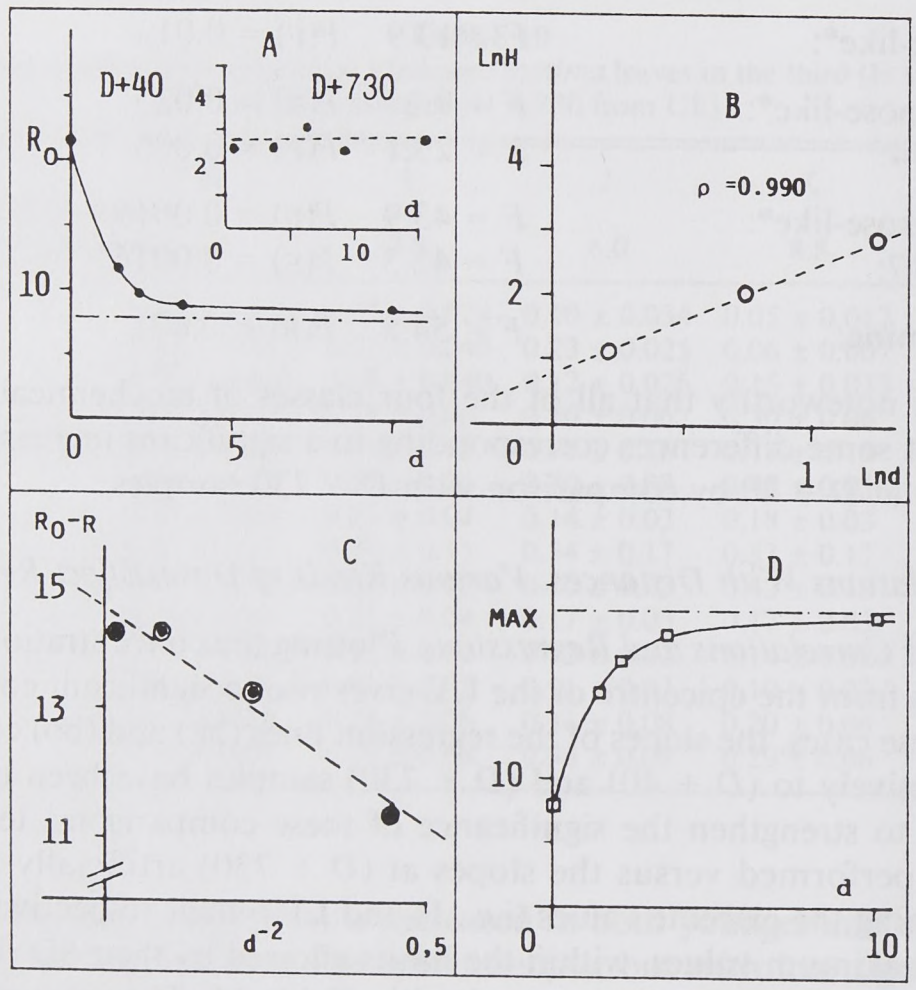


Fig. 1. An algebraic study of the response (Ri) of glucose concentrations at D + 40 according to the distance (di) to the epicentre of the U.E. A = natural units (the response at D + 370 is given for comparison). B = Hill plot (see text). C = differential response versus d^{-2}. D = theoretical differential response according to distance d.

Plotting dn versus R/d^n with the upper 2 and 3 points give a fairly good estimation of $R_{Max} = 15.0 \pm 0.7$ units (nmol per mg). Then, the Hill plot:

$$\ln[Ri/(100 - Ri)] = n \ln di - \ln(L) \qquad (2)$$

illustrated by Figure 1B gives $n = 2.00$ and $L = 0.65$ m. This reveals that the response varies according to d^{-2}, like most electromagnetic events. Accordingly, roughly representing the results as $(Ro\text{-}R)$ versus d^{-2} would have given a fairly linear plot ($\rho = -0.971$; $p(t) = 0.02$; $b = -6.59$: Figure 1c) i.e. a much better correlation than using natural units ($\rho = -0.580$!). Then the theoretical curve would actually be:

$$Ri = 14.95 + 8\, di^2/(0.65 + di^2) \qquad (3)$$

as illustrated on Fig. 1D.

Nothing similar could be obtained from control samples using plants extracted at (D + 730), as illustrated inside Fig. 1A.

Raffinose and ribose concentrations exhibit quite a different relation versus distances: minimum values occur at the epicentre, whereas maximum ones can be observed at an intermediate distance. Assuming that the energy

gradient can be roughly linearized in exponential units, and in a decreasing value from distances to the epicentre, one can replot the data using R versus e^{-d}. This leads to typical biphasic dose/effects relationships (Figures 2A and 2B) as encountered in ligand-receptor interactions (Bounias & Pachéco, 1972; Sanchez & Changeux, 1965) (Figure 2C).

The equation of such a phenomenon is rather complex (Bounias, 1987), but highly representative of a number of toxicological stresses in plants (Stevens & Merril, 1985) (Fig. 2d).

Threonine and serine exhibit a similar response, except that concentrations reach an intermediate minimum instead of a maximum value (Figures 3A and B in small frames).

In this case, plotting Ro-R versus e^{-d} gives curves similar to those on Fig. 2, except that values reach zero for $e^{-d} = 1$ (Figures 3A and 3B). Similar features encountered under the stress of toxins or electromagnetic parameters are shown on Figures 3C and 3D, respectively.

Alteration of Functional Relationships in Connection With the UE

It has been shown that the algebraic form of the relations between two biochemical parameters may prove to be a sensitive way for evidencing stress effects (Bounias, 1975; Bounias et al., 1986). This might allow the character-

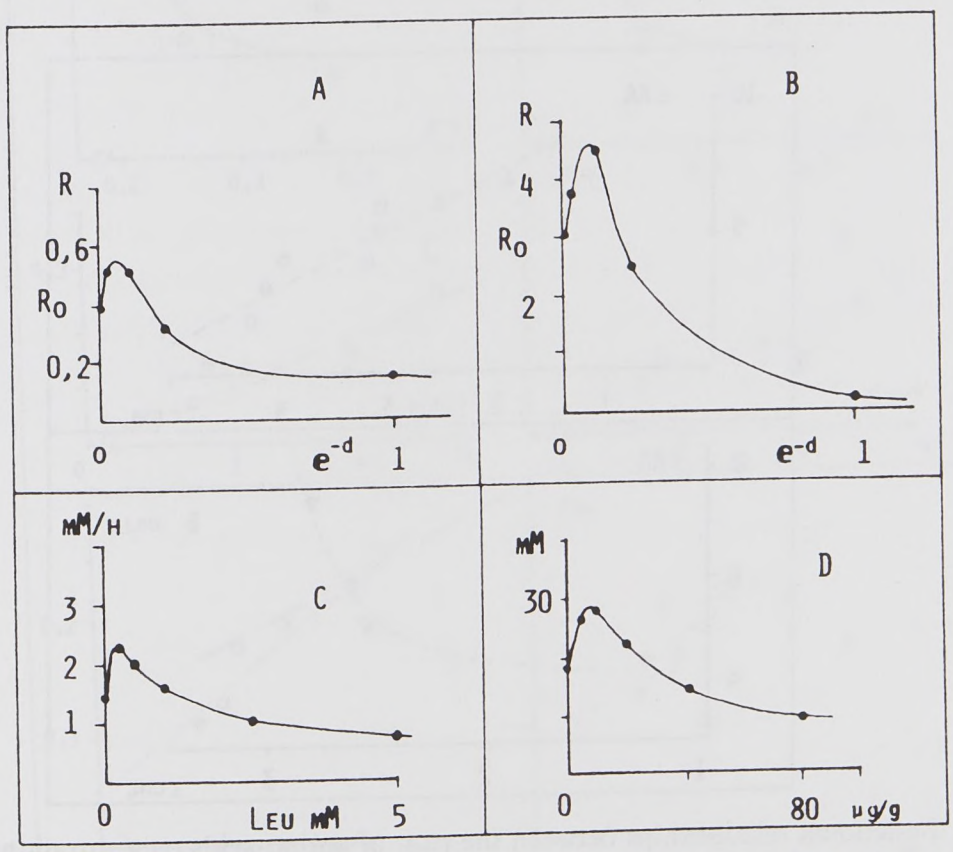


Fig. 2. Biphasic dose/effect relationships: A and B resp. = Raffinose and Ribose-like concentrations versus e^{-d}. C = control of Barley leaves phosphatases by L. leucine (Bounias & Pachéco, 1972). D = control of Lettuce roots growth (mm) by solstitiolide (μ/g). (Stevens and Merril, 1985).

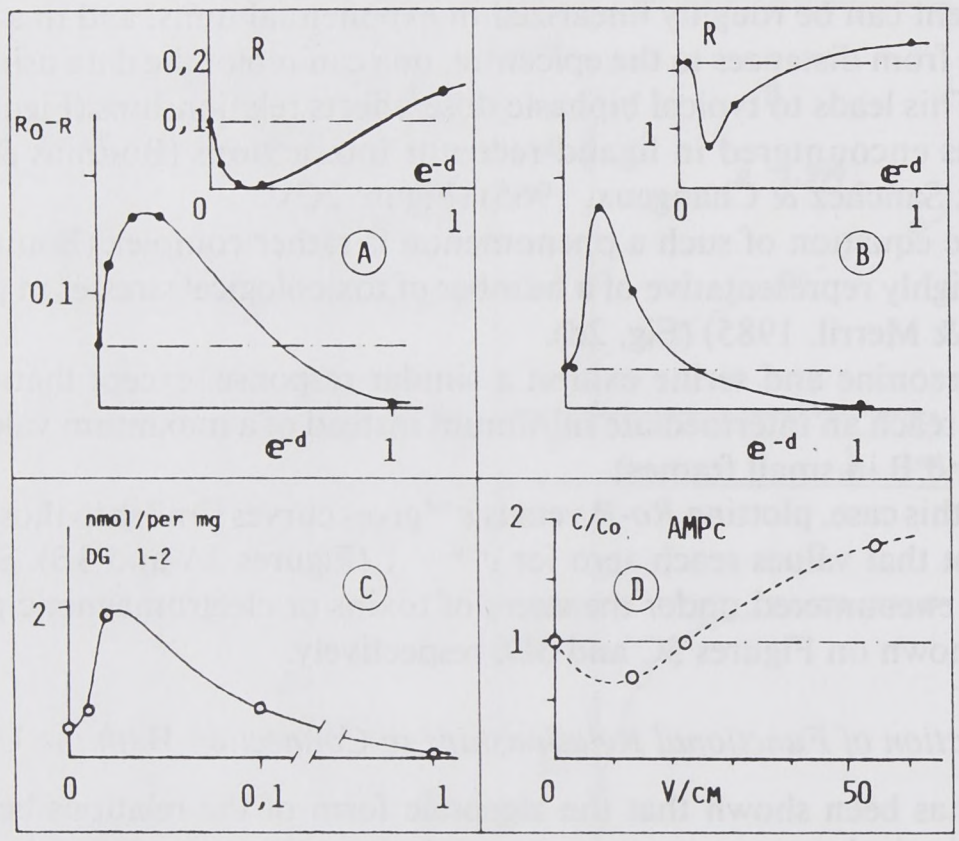


Fig. 3. Biphasic dose/effect relationships: A and B resp. = theonine and serine concentrations (in small frames) or differential levels (Ro-R) versus e^{-d}. C = action of a bacterial toxin on mosquitoes lipids (Nizeyimana et al., 1987). D = action of and incident electromagnetic field intensity on cAMP levels in cultured bone cells of rat (Somjen et al., 1982).

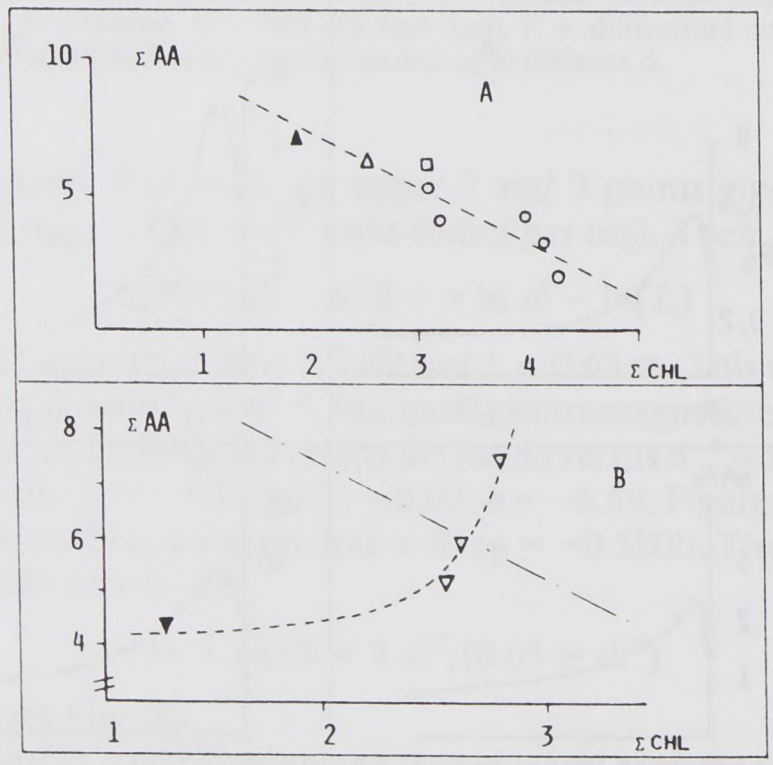


Fig. 4. Functional relationships between the sum of amino-acids concentrations (ΣAA = Ser + Asp + Asn + Glu + Thr + Pro + Ile + Leu + Phe + Try + X1 + X2 + X5) and the sum of chlorophyll pigments (Chl.A + Chl.B normal and oxidized forms) + Pheophytins + chlorophyllids + Protochlorophyllids). A = normal relation: 0 = D + 730 series; □ = distance 10 m at D + 40; ▲ = distance 1.5 m at D + 4. △ = distance 15 m at D + 15. B = exposed points at D + 40: ▼ = point at epicentre of U.E. The axis line (– · –) on Fig. 5B indicates the position of the normal regression.

101

ization of stresses even in particular cases where no deviation of the concentrations from the normal range of natural values can be detected.

The Functional Relationships Between Free Amino Acids And Chlorophyll Pigments (*Figure* 4). First suggested by Jain (1966), were pointed out both in dicotyledones and monocotyledones (Bounias, 1972–1975), following experiments conducted in controlled artificial conditions in growth chambers.

A detailed analysis of the biochemical content of samples collected at $D + 730$, show these functional relationships to be found again (Figure 4A).

This means that the deviations observed in the range of the natural variability do respect normal physiological law, despite uncontrolled (field) conditions.

Plotting the same parameters from samples collected at $D + 40$ surprisingly led to a completely reversed relation (Figure 4B).

It is noteworthy that not only the points situated far from the epicentre at

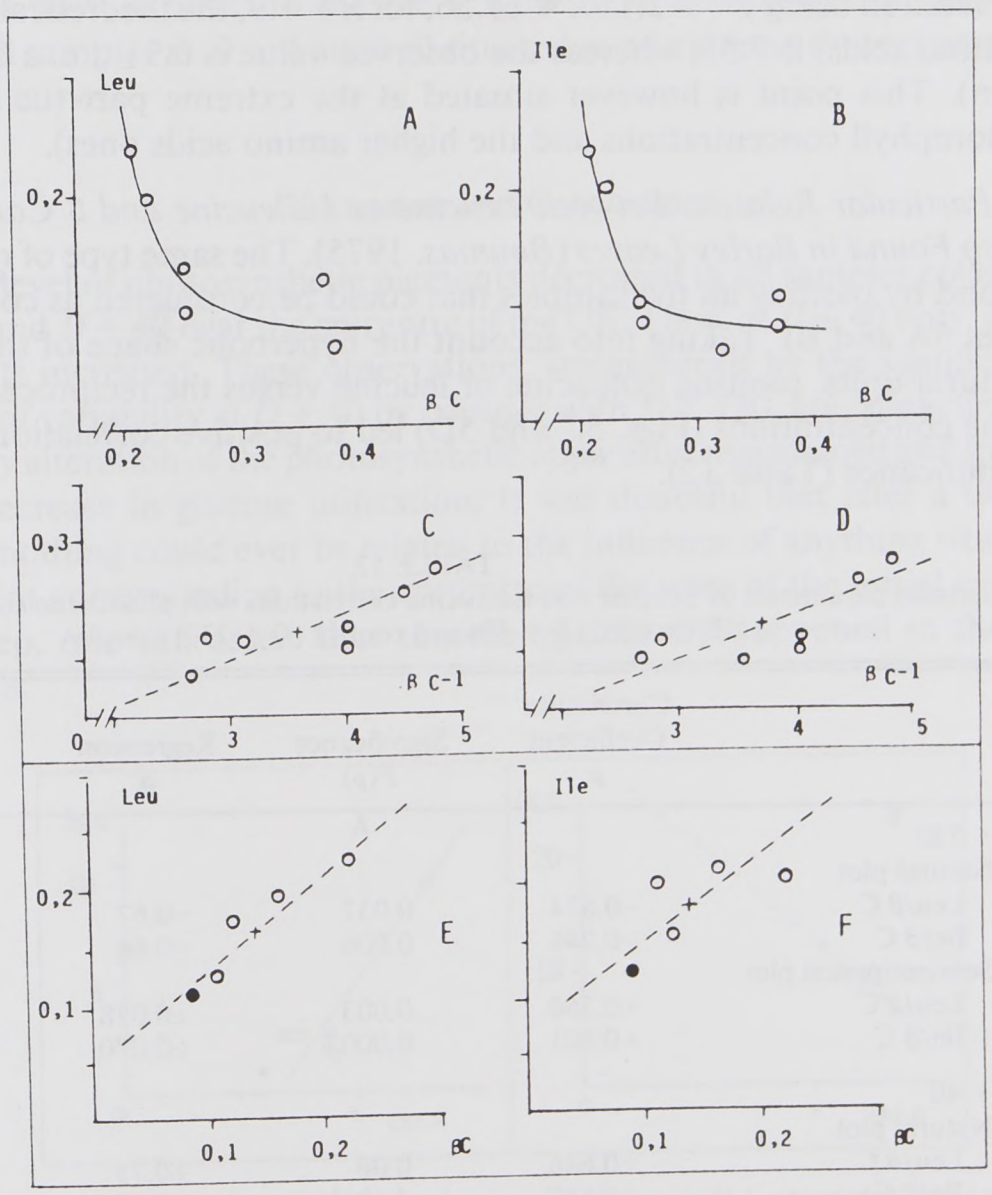


Fig. 5. Functional relationships between leucine or isoleucine and β carotene concentrations (nmol per mg): A and B: control samples at D + 730 in natural units and C, D, in semi reciprocal units. E and F: samples at D + 40 in natural units; the solid dots represent the point at epicentre.

TABLE 11
Comparisons of the regression slopes of biochemical levels versus distances from epicentre of the UE

Biochemicals	Correlations at: $D + 40$ ρ	(P)	$D + 730$ ρ	(P)	Comparisons of Slopes b_E	b_0	$P(b_E/b_0)$	$br \pm$	$P(b_0/br)$
β Caroten	0.90	(0.04)	−0.83	(0.08)	0.065	−0.027	(0.014)	0.047	(0.125)
Chl.A	0.84	(0.07)	−0.76	(0.13)	0.092	−0.019	(0.043)	0.036	(0.19)
Chl.A/Pheo	0.97	(0.004)	0.25	(0.68)	0.11	0.011	(0.006)	0.06	(0.04)
Lutein	0.98	(0.003)	−0.61	(0.27)	0.111	−0.014	(0.002)	0.032	(0.007)
Valine	0.53	(0.36)	−0.95	(0.015)	0.05	−0.04	(0.13)	0.02	(0.09)
Proline	0.96	(0.01)	0.75	(1.96)	0.17	0.11	(0.11)	0.016	(0.2)
Isoleucine	0.79	(0.11)	0.29	(>0.5)	0.05	0.01	(0.17)	0.01	—

$D + 15$ and $D + 40$ are situated well on the normal curve, but also the point corresponding to the epicentre at $D + 40$ clearly fits the same curve. The correlation being $y = -2.11\,x + 11.56$, for $x = 1.9$, the theoretical value for y (amino acids) is 7.55, whereas the observed value is 6.91 (i.e. a 8.5% deviation). This point is however situated at the extreme part (i.e., the lower chlorophyll concentrations and the higher amino acids ones).

A Particular Relation Between Leucine or Isoleucine and β Carotene Was Also Found in Barley Leaves (*Bounias*, 1975). The same type of relation was found by plotting all the samples that could be considered as controls (Figures 5A and B). Taking into account the hyperbolic shape of the curves in natural units, plotting isoleucine or leucine versus the reciprocal of β carotene concentrations (Figs. 5C and 5D) led to positive correlations of higher significance (Table 12).

TABLE 12
Statistics parameters of Leucine and isoleucine correlations with β carotene concentrations in UE exposed ($D + 40$) and control ($D + 730$) samples

	Correlation Coefficient ρ	Significance $P(\rho)$	Regression d	Slope σ_d	
$D + 730$					
Natural plot					
Leu/β C	−0.674	0.037	−0.67	±0.42	*
Ile/β C	−0.746	0.006	−0.66	±0.34	
Semireciprocal plot					
Leu/β C	+0.760	0.003	+0.078	±0.038	*
Ile/β C	+0.801	0.0007	+0.070	±0.030	
$D + 40$					
Natural plot					
Leu/β C	+0.646	0.06	+0.75	±0.51	*
Ile/β C	+0.867	2.10^{-5}	+0.79	±0.26	

* Differences not significant at $(1 - P) < 0.01$.

The natural plots obtained from samples collected at $D + 40$ (Figs. 5E and 5F) exhibited positive, fairly good correlations. In all cases, leucine and isoleucine parameters are rather similar, without statistically significant differences.

A Positive Correlation Links Glucose to Chlorophyll A Concentrations in Normal Leaves of Barley (*Bounias,* 1975). Here also, using natural units, the concentrations of glucose are positively correlated to those of chlorophyll A, with all samples that can be considered as controls (i.e., B, G to L). For $N = 9$ pairs, $\rho = +0.824$ ($p = 0.04$), and $b = 8.98$ ($\sigma b = 3.56$). Then, with the 4 most exposed samples of D + 40 (i.e., C, D, E, F,), there appears a significantly negative correlation: for $N = 4$, $\rho = -0.906$ ($p = 0.06$) and $b = -19.6$ (σb = 5, 3). The low variability of carbohydrate and pigment levels at $D + 730$ did not allow a better correlation to be observed because of the gathering of the points in one limited area. However, this basic phenomenon, which was repeatedly found because of stress conditions, was completely reversed in the samples most exposed to the UE (Figure 6). It is noteworthy that, again, exposed samples at $D + 4$ are well situated at an extreme (lower) part of the control curve.

Discussion and Conclusions

The level of photosynthetic pigments decreased in all samples collected at $D + 4$ and $D + 40$ near the epicentre of the UE. Then, at $D + 40$ only, glucose contents increased. These observations, strengthened by the significant increase of variability at $D + 40$ by contrast with $D + 730$, are characteristic of an early alteration of the photosynthetic apparatus, maintained and followed by a decrease in glucose utilization. It was doubtful that after a two-year delay, nothing could ever be related to the influence of anything situated at the point corresponding to the epicentre of the trace of the initial event. At this step, one can assert that something actually happened in the studied area.

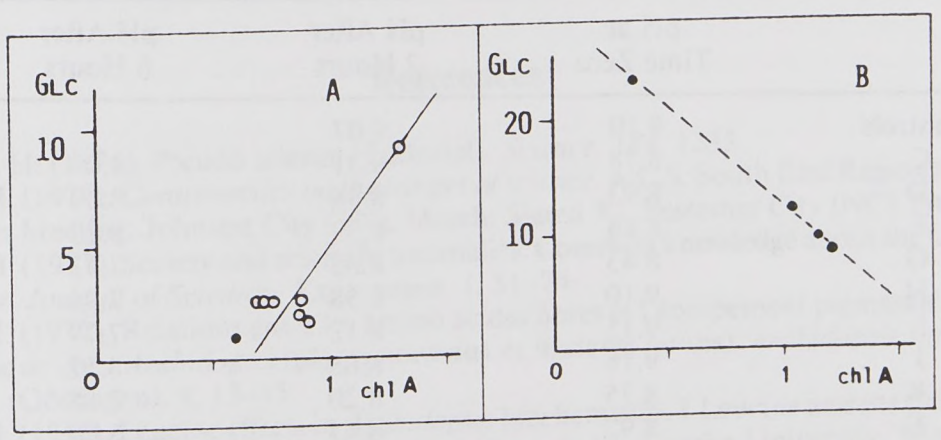


Fig. 6. Functional relationships between glucose and chlorophyll A concentrations (nmols per mg). A = control sample (●) = distance 1.5 m at D + 4. B = 4 most exposed samples at D + 40.

The significant correlations obtained by plotting the results with distances from the UE epicentre, suggest that the "thing" that happened globally elicited biochemical effects as a reciprocal function of the distance from the source. It is noteworthy that in some cases, such as for glucose, a d^{-2} dependent relation was evidenced, consistent with a radiative energy emission.

Some apparent exceptions did occur for various carbohydrates and amino acids, but a more detailed algebraic study revealed that they were quite consistent with typical cases of biphasic dose/effect pharmacological or toxicological relations, including chemical but even physical (electromagnetic) sources of stresses (Somjen et al., 1982). This confirmed that the "thing" that happened did generate a distance–dependent energetic source of stress.

In a last step, it was clearly emphasized that dramatic changes from the natural features of functional relationships occurred in the samples that were the most exposed to the unknown event. Here, two phases were clearly distinguished; in the first one ($D + 4$), the metabolism of the most exposed samples was shifted to the most extreme parts of the normal equations, whereas in the second one it was situated on the extreme points of reversed equations. This indicates very deep, delayed physiological effects. Since chemical sources could hardly explain such a strong remaining effect after almost two months, the hypothesis of a wavy radiative source remains the more likely, since electromagnetic impulses are able to generate delayed responses (Gorczynska et al., 1982).

From a series of comparisons with known sources of stress (Bounias, 1972–1983c), it could be suggested that the observed effects of $D + 4$ might reflect a stress of the same type as would have caused a dim light shock, whereas at $D + 40$, the symptoms are partly—but only partly—consistent with an alteration of the oxidative phosphorylation mechanisms. None

TABLE 13

pH of the soil as determined according to the delay after solubilization in the clod-earth of $D + 40$ and $D + 730$ samples and in control soil samples treated with cement powder (P), cement supernatant (S) and liquid mortar (M), by comparison with controls

	pH at Time Zero	pH After 2 Hours	pH After 6 Hours	pH After 24 Hours
Controls	9.10	9.07		
C	8.78	8.31	8.09	7.94
D	8.93	8.48	8.09	8.05
F	8.86	8.39	8.23	8.10
G	8.43	8.02	7.93	7.66
H	9.10	8.58	7.94	7.62
I	9.15	8.12	7.79	7.56
J	9.16	8.65	8.12	7.77
K	8.75	8.20	7.88	7.67
L	8.92	8.45	8.07	7.65
P	10.91	11.22	—	—
S	11.03	11.14	—	12.80
M	10.15	10.67	—	12.70

105

could be clearly explained, for instance, by ionizing (Bounias, 1973) radiations, or thermic or water stresses (Bounias, 1983c).

It remains to examine the challenging hypothesis of a mystification by ill-intentioned people. One of the suggested explications was that somebody might have spread some cement on the area. In this case, the pH of the soil should have been modified; the results of pH determinations in the clods gave the results summarized in Table 13.

It is clear that no significant effect of either distance from epicentre or delay from $D + 40$ to $D + 730$ can be found ($p \geq 0.84$ and 0.52 resp. from variance analysis).

Moreover, nobody, except the author, knew in advance when and where or what was to be sampled and analyzed on the site. Thus, one can hardly imagine how anybody could have artificially elicited the observed results (except by invoking some ESP phenomenon!) so that the reliability of the results apparently remain significant.

.It was not the aim of the author to identify the exact nature of the phenomenon observed on the 8th of January 1981 at Trans-en-Provence. But it can reasonably be concluded that something unusual did occur that might be consistent, for instance, with an electromagnetic source of stress. The most striking coincidence is that at the same time the French physicist J. P. Petit was plotting the equations that led, a few years later (Petit, 1986), to the evidence that flying objects could be propelled at very high speeds without turbulences nor shock waves using the magnetohydrodynamic effects of Laplace force action!

It should now be most interesting to determine a catalog of the biochemical effects of electromagnetic waves, particularly the spectra of the continuous effects of varying em parameters, such as frequencies, intensities modulation and pulses. A number of experimental data found in the literature (Bounias, 1984) and in theoretical studies (Veve & Bounias, 1987) suggest that such a program would be of wide importance not only for UFO studies, but also, for instance, in medicine (Douss et al., 1985; Somjen et al., 1982) and related areas.

References

Abelson, P. H. (1974). Pseudo science (Editorial). *Science, 184*, 1233.

Bauer, H. H. (1979). *Controversies on the fringes of science.* A.C.S. South East Regional Student Affiliates Meeting, Johnson City (TN), March; Sigma Xi, Bessemer City (NC), November.

Bauer, H. H. (1987). Society and scientific anomalies: Common knowledge about the Loch Ness Monster. *Journal of Scientific Exploration, 1*, 51–74.

Bounias, M. (1972). Relations entre les amino acides libres et l'équipement pigmentaire photosynthétique chez *Arabidopsis* (plants normaux et mutants viridis). *Arabidopsis Information Service*, (Göttingen), *9*, 13–15.

Bounias, M. (1976). Leucine effects in *Arabidopsis* biochemistry. I-Leucine and the photosynthetic apparatus. *2nd Int. Symp. Arabidopsis Res.*, J. W. Goethe University, Sept. 13–15, Frankfurt, Main, C.R. in: *Arabidopsis Information Service, 13*, 96–98.

Bounias, M. (1972). Etude biochimique et cytochimique de l'appareil photosynthetique chez des végétaux supérieurs normaux et mutés. *Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences*, Univ. Cl.

106

Bernard Lyon I—(n° Ordre 98), 146 p., 145 tableaux numériques, 47 fig., 10 planches photographiques microscopiques, 255 réf. bibliographiques.

Bounias, M. (1973). Equipement pigmentaire des cotylédons *d'Arabidopsis* après irradiation "gamma" des graines. *Arabidopsis Information Service (Göttingen), 10,* 26–28.

Bounias, M. (1975). Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthétiques et les acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'Orge et d'Arabidopsis. *Canadian Journal of Botany, 53,* 708–719.

Bounias, M. (1976). Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. I—Les glucides libres. *Analusis, 4,* 87–93.

Bounias, M. (1979). Variations in the Hill parameters of haemolymph alpha-glucosidase kinetics as compared by new algebraic methods at three nymphal stages of workerbees (*Apis mellifica, mellifica* L.). *Comparitive Biochemistry, 63B,* 407–417.

Bounias, M. (1980a). *N*(1-naphtyl) ethylenediammonium dichloride as a new reagent for nanoquantification of glucids on thin-layer plates by a mathematical calibration process. *Analytical Biochemistry, 106,* 291–295.

Bounias, M., & Bounias, A. (1980b). Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. II—Les acides aminés libres. *Analusis, 8,* 287–295.

Bounias, M. (1983a). Perturbations biochimiques décelées dans une luzerne sauvage (Medicago minima), en relation avec l'observation d'un phénomène aérospatial non identifié. *Note Technique CNES/GEPAN,* (ISSN 0750-6694), *16,* 41–64.

Bounias, M. (1983b). L'analyse biochimique quantitative par nano-chromatographie en couche mince. Masson Ed. (Paris).

Bounias, M. (1983c). Caractérisation des traumatismes biochimiques végétaux. Application à l'étude des dismetabolismes consécutifs à evenement d'origine in connue. Rapport de fin de contrat: Ministére de l'Agriculture/Centre National d'Etudes Spatiales, Nr. 80-0796/83-009, pp. 109.

Bounias, M. (1984). Déterminisme électromagnétique dans les fonctions biochimiques fondamentales: une nouvelle pharmacologie. *Coll. Internat. de Biologie Théorique,* (Sté Internat. de Biologie Mathématique, Fresnes, 6-12-84), 16 pp.

Bounias, M. (1987). Stimulation transitoire de l'activité d'une enzyme par un effecteur. Dépôt sous pli cacheté, *Académie des Sciences (Paris),* n° 16709.

Bounias, M., & Pachéco, H. (1972). Role de la L-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline chez l'Orge. *Comptes' Rendus de l'Académie des Sciences (Paris), 275,* 201–204.

Douss, T., Santini, R., Deschaux, P., & Pachéco, H. (1985). Augmentation du pouvoir immunogène de cellules cancéreuses soumises à l'action des micro-ondes. *Comptes' Rendus de la Société de Biologie, 179,* 299–306.

Gorczynska, E., Galka, G., Krolikowska, R., & Werzynowicz, R. (1982). Effect of magnetic field activity of cytochrome oxidase not moved or moved relative to magnetic field lines. *Physiological Chemistry & Physics, 14,* 201–207.

Jain, M. L. (1966). A biochemical study of yellow virescens and light green suppressors in Barley. *Genetics, 54,* 813–818.

Loftus, E. F. (1979). Eyewitness testimony. Cambridge M.A.: Harvard University Press.

Nizeyimana, B., Bounias, M., & Vivarés, C. P. (1987). Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptére) par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelengis.* II Les lipides abdominaux. *Comptes Rendus de la Société de Biologie, 181,* 355–363.

Petit, J. P. (1986, September). Shockwave cancellation in gaz by Lorentz force action. Proc. 9th Meeting on Magnetohydrodynamic Electrical Power Generation, Tokyo.

Sanchez, C., & Changeux, J. P. (1966). Sur les propriétés de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'un mutant d'E. Coli K 12. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 48,* 705–713.

Somjen, D., Korenstein, R., Fischler, H., & Binderman, I. (1982). Effects of electric field intensity on the response of cultured bone cells to parathyroid hormone and prostaglandin. *Excerpta Medica, 589,* 412–416.

Stevens, K. L. & Merril, G. B. (1985). Sesquiterpene Lactones and Allelochemicals from *Centaurea* Species. In: A. C. Thompson (Ed.), *The Chemistry of Allelopathy,* (pp. 83–98).

Sturrock, P. A. (1987). An analysis of the condon report on the Colorado UFO Project. *Journal of Scientific Exploration, 1,* 75–100.

Vève, J. C., & Bounias, M. (1987). Etude théorique de l'action des champs électromagnétiques sur les fonctions biochimiques. ler congrès international de Kinésithérapie énergétique, Tours, 17–18 Oct., 1987 (4 pp.).

INTERACTIONS TOXICOLOGIQUES ENTRE HOTE ET PARASITE : ETUDE DU COUPLE Pin sylvestre / Ceratocystis -

Collaboration avec le Centre de Recherches Forestières d'Orléans et le Laboratoire des Médiateurs Chimiques de Brouessy -

1°- Soutenance de thèse E.P.H.E.

2°- C.R. Soc. Biol., 184, 114-122

3°- Colloque -

Les résultats obtenus orientent, maintenant, les recherches, vers l'étude de la spécificité d'action de l'alcool conifèrylique, considéré comme phytoalexine, vis à vis de souches de Ceratocystis parasitant soit le Pin sylvestre, soit d'autres arbres, et vis à vis du Pin sylvestre lui-même ou d'autres végétaux (Thèse en cours).

1°

109

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Section des Sciences de la Vie et de la Terre

THESE

présentée

par

Marie-Hélène LE VAGUERESSE-DAURADE

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

REPONSE BIOCHIMIQUE DES PINS SYLVESTRES AUX ATTAQUES DU SCOLYTE *IPS SEXDENTATUS* ET DU CHAMPIGNON ASSOCIE *CERATOCYSTIS BRUNEOCILIATA*

soutenue le 3 MAI 1990 devant la commission d'examen

J. BONS	- Président
M. BERGOIN	- Rapporteur
M. BOUNIAS	- Examinateur
P. COULOMB	- Examinateur
C. VAGO	- Examinateur

- Membre de l'Institut-

Laboratoire de :Pathologie Comparée Directeur : Professeur M.BERGOIN
Ecole Pratique des Hautes Etudes (Section des Sciences de la Vie et de la Terre)

Laboratoire de : Biochimie Département de Phytopharmacie INRA Montfavet.
Directeur : Professeur M. BOUNIAS..

110

SOMMAIRE

- **INTRODUCTION.** 9

- **CHAPITRE I - GENERALITES.** 12

- A. La plante-hôte : Pin sylvestre. 13
  Les tissus concernés. 13
  Le fonctionnement végétal de l'arbre. 15

- B. Les entomoparasites. 15
  Ips sexdentatus. 16
  Impact économique. 16
  Mode de développement des Scolytidae. 16

- C. Le champignon vecteur secondaire. 19
  Les Ceratocystis. 20
  Ceratocystis bruneociliata. 20

- D. Différentes manifestations des interactions hôte-parasite. 21

I. Hôte-insecte. 21

a. Les phases de l'attaque. 21
b. Les phases de la réaction de défense de l'hôte. 22

II. Hôte-champignon. 23

a. Facteur temps : chronologie de la première phase de l'infection. 24
b. Les éliciteurs et les phytoalexines. 26
   1. Les éliciteurs. 27
   2. Les phytoalexines. 26

III. Mécanismes de défense et de protection naturelle.27

a. Réaction primaire. 27
b. Réaction secondaire. 28
c. Elicitation d'un troisième type de défense 28
d. La cutine. 29
e. Mécanismes biochimique de défense des végétaux. 29
   1. Les Glucides. 30
   2. Relation entre glucides et infection. 31
   3. Les Phénols. 31
   4. Facteurs influençant la formation des phénols. 33
      α) Ressources énergétiques glucidiques. 33
      ß) Variation saisonnières des composés glucidiques. 33
   5. Autres facteurs. 34
   6. Enzymes intervenant dans la synthèse des acides phénoliques. 34
   7. Réactions enzymatiques : Réactions de lésions des tissus de l'hôte. 35
   8. Réactions à l'infection fongique. 35
   9. Relations phénols glucides. 36
   10. La Lignification. 37

111

- CHAPITRE II - MODELE BIOLOGIQUE. 39

- A. Les arbres. 41

- B. Les insectes. 41

- C. Les champignons. 42

- CHAPITRE III - METHODES. 43

- A. Attaques artificielles. 44

- B. Mesures de vigueur des arbres. 46

- C. Hemolymphe du parasite : Extraction des glucides. 46
Systèmes éluants utilisés. 48

- D. Liber de l'hôte : 49

I. Extraction des glucides. 50

a. Mise au point du solvant d'extraction. 51
1. Les solvants d'extraction. 53
2. Le traitement des plaques avant dépôt des extraits. 55

b. Protocole d'analyse des glucides ainsi que des hétérosides phénoliques et des phénols conjugués. 56
1. Ajustement des extraits. 56
2. Préparation des plaques. 56
3. Le dépôt. 57
4. Les solvants de migration. 58
5. Enregistrement des hétérosides et des phénols conjugués. 58
6. Révélation des glucides. 60
7. Enregistrement des glucides. 61

II. Extraction des phénols. 62

a. Ajustement des extraits. 62
b. Préparation des plaques. 62
c. Le dépôt. 63
d. Le système migratoire. 63
e. Enregistrement des phénols libres. 63

III. Hydrolyse des hétérosides. 65

a. Mise en évidence de composés hétérosidiques. 65
b. Hydrolyse acide. 65
c. Hydrolyse enzymatique. 65
d. Méthodes statistiques. 66

112

- CHAPITRE IV - RESULTATS : 69

- A. Hémolymphe de scolytes. 71

- B. Composition glucidique du liber des arbres témoins. 72

I. Glucides libres. 72

a. Résultats. 72
1. Clône H8. 72
2. Clône H5. 75

b. Etude de l'homogénéité de la distribution des fractions glucidiques dans le liber des troncs. 76
1. Clône H8. 76
α) Corrélation entre les concentrations de glucides à 1 m et à 3 m. 77
ß) Variance. 77
2. Clône H5. 79
α) Corrélation entre les concentrations glucidiques à 1 m et à 3 m. 79
ß) Variance. 80
3. Conséquences pour la mise au point du protocole définitif. 80

c. Arbres témoins Orléans. 80
1. Vigoureux. 81
2. Non vigoureux. 83

II. Glucides conjugués. 84

a. Hydrolyse acide. 86
b. Hydrolyse enzymatique. 89
c. Conséquences. 98
1. Clône H8. 100
2. Clône H5. 101
3. Arbres témoins Orléans. 103
α) Vigoureux. 104
ß) Non vigoureux. 104

- C. Cinétique de réponse à une perforation artificielle. 107

I Glucides libres. 107

II. Glucides conjugués. 108

III. Phénols libres. 124

- D. Cinétique de réponse à l'attaque par les scolytes Ips sexdentatus. 126

I. Glucides libres. 126

II. Glucides conjugués. 127

III. Phénols libres. 141

113

- E. Cinétique de réponse à l'infection par le champignon Ceratocystis bruneocilliata. 146

I. Glucides libres. 146

II. Glucides conjugués. 147

III. Phénols libres. 159

- CHAPITRE V - DISCUSSION : 167

- A. Effets du forage mécanique. 169
Conclusions sur les effets du forage mécanique. 172

- B. Infestation par un insecte. 174
Conclusions sur les effets de l'infestation par Ips sexdentatus. 181

- C. Contamination par Ceratocystis bruneociliata. 182
Conclusions sur les effets de la contamination par Ceratocystis bruneociliata. 188

- D. Conclusions Générales. 189

- BIBLIOGRAPHIE : 195

- ANNEXES : 205

REPONSE BIOCHIMIQUE DES PINS SYLVESTRES AUX ATTAQUES DU SCOLYTES *IPS SEXDENTATUS* ET DU CHAMPIGNON ASSOCIE *CERATOCYSTIS BRUNEOCILIATA*

Marie-Héléne LE VAGUERESSE-DAURADE

Soutenue le 3 MAI 1990

RESUME

Les prélèvements de liber effectués sur des pins sylvestres agés de 34 ans ont permis d'analyser leur composition en glucides et en phénols libres et conjugués, au bout de 7, 14 et 21 jours après les traitements suivants : 1° forage mécanique, 2° infestation par un scolyte (Ips sexdentatus) 3° contamination par un champignon (Ceratocystis brunéociliata), fréquemment associé à Ips.

On ne note aucune variation de la composition glucidique sous l'effet du traitement par Ips, alors que le forage mécanique entraîne une légère diminution des quantités de saccharose, au point de lésion, pendant toute la durée des observations. De même, l'inoculation du champignon produit une baisse des glucides libres (glucose et fructose) et des réserves circulantes (saccharose) de 7 à 21 jours.

En ce qui concerne les phénols libres, les 3 traitements ont un effet sur une fraction de mobilité comparable à celle de l'acide cinnamique. Les effets du forage mécanique ne se manifestent sur cette fraction qu'à 7 jours, alors que pour les 2 autres traitements, ils se prolongent encore à 14 jours. Deux autres phénols libres semblent caractéristiques, l'un de l'infestation par l'insecte, l'autre de l'inoculation par le champignon.

Alors que Ceratocystis n'entraîne des variations que sur une fraction hétérosidique qui a été identifiée au ß-glucoside de l'alcool coniférylique, l'infestation par Ips se traduit par des variations au niveau de plusieurs hétérosides. La perforation artificielle ne provoque, quant à elle, aucune modification des glucides conjugués et présente donc la plus faible toxicité apparente.

115

2°

C. R. Soc. Biol., 1990, *184*, 114-122.

Biochimie végétale.

Étude de la structure du principal hétéroside hydrosoluble du liber du Pin sylvestre

par Marie-Hélène Daurade-Le Vagueresse, Michel Bounias, Brigitte Frerot *, Marie-Louise Milat * et Isabelle de Cruz *

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, F 84143 Montfavet Cedex.
** Laboratoire des Médiateurs chimiques, Brouessy, F 78470 Saint-Rémy-les-Chevreuse.*

(reçue le 6 juin 1990).

Summary. — One of the major heterosidic fractions extracted from the liber of scoth fir trees has been isolated by HPLC. Acidic hydrolysis or enzymic splitting by a β-glucosidase release free glucose. By contrast, an α-glucosidase remains unactive on this fraction. The released aglycone exhibits a chromatographic mobility and a solid phase UV spectrum similar to those of coniferyl alcohol. The structure of this heteroside can thus be tentatively identified to the β-glucoside of coniferyl alcohol. Its variations will be examined following artificial inoculation of the trees with a pathogenic fungus.

Résumé. — L'une des principales fractions hétérosidiques extraite du liber du Pin sylvestre a été isolée par CLHP. L'hydrolyse acide ou par une β-glucosidase libèrent du glucose, tandis qu'une α-glucosidase reste inactive. L'aglycone libéré présente une mobilité chromatographique et un spectre UV en phase solide identiques à ceux de l'alcool conifèrylique. La structure du composé paraît donc identifiable à celle du β-glucoside de l'alcool conifèrylique. Les variations de concentration de cet hétéroside seront examinées en relation avec l'inoculation artificielle d'un champignon parasite dans le tronc des arbres.

L'induction de résistance d'une plante-hôte à l'infection par un agent pathogène s'accompagne de la mise en œuvre d'une série de processus biochimiques [Bell (1)] qui exigent de la part du végétal une importante dépense d'énergie [Sequeira (2)]. Celle-ci se traduit, d'une part, par l'édification, autour de la zone infectée, de barrières cellulaires

116

d'« apposition », qui freinent la diffusion de l'agent pathogène [Strack, Heilemann et Klinkott (3)] et, d'autre part, par la libération de composés toxiques pour l'agresseur. Parmi ces composés figurent des substances de structure phénolique [Beart, Tilley et Haslam (4)] et de nombreux dérivés sont impliqués dans des processus de lignification [Friend et Threlfall (5)].

Lors d'une étude de la réponse du pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) à l'attaque d'un champignon pathogène *(Ceratocystis bruneociliata),* nous avons analysé les composés phénoliques du liber des arbres, de manière à pouvoir en examiner les variations sous l'action de l'agent infectieux.

Le présent travail décrit les résultats obtenus quant à la composition initiale des arbres provenant de clônes sélectionnés, ainsi que la stucture de l'un des principaux composants phénoliques observés.

Matériel végétal et techniques. — Les pins sylvestres (*Pinus sylvestris* L.) utilisés au cours de cette étude sont situés dans la forêt domaniale d'Orléans (France). Leur âge moyen était de 24 ± 4 ans et le diamètre moyen de leur tronc de 58 ± 9 cm, au moment de l'étude. Des prélèvements de liber de 1,5 × 0,5 cm et d'une épaisseur moyenne de 1,25 ± 0,25 mm, ont été effectués à 1 m et 3 m de hauteur. Leur poids moyen était de l'ordre de 100 mg.

La nécessité d'analyser parallèlement la composition glucidique du liber nous a conduit à extraire les composants par broyage des échantillons dans des tubes de Potter en présence d'eau distillée. Les solvants organiques dissolvent, en effet, des substances résiniques et des dérivés mélaniques dont la présence perturbe les chromatogrammes [Le Vagueresse-Daurade (6)]. Les glucides libres et conjugués sous forme d'hétérosides, ainsi que les phénols libres, ont été chromatographiés sur plaques de gel de silice d'après des techniques précédemment décrites [Bounias (7); Bounias, Daurade et Lizzi (8)]. Les spectres des composés séparés sur plaques, soit après révélation chimique à 540 nm pour les glucides libres ou conjugués révélés au dichlorhydrate de N-naphtyl-éthylène-diamine (9), soit par mesure directe de l'absorbance en ultra-violet (λ = 310 nm pour l'ensemble des phénols libres ou conjugués), ont été établis par enregistrements directs en phase solide, sur des plaques chromatographiques (Daurade-Le Vagueresse et Bounias (10)].

Les hétérosides ont été hydrolysés, soit par l'acide chlorhydrique 2N, pendant 6 heures à 50° C, soit par voie enzymatique. Pour ce dernier cas, les extraits ont été incubés pendant 2 heures à 30° C, en milieu tampon phosphate 100 mM à pH 6,8 en présence, soit d'une α-glucosidase de levure (Serva 22-823), soit d'une β-glucosidase d'amande douce (Serva 22-830).

L'hétéroside « H19 » a été isolé et purifié à partir des extraits bruts par chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Une colonne

de silice greffée de type « amine » (Dupont de Nemours) a été utilisée avec l'éluant binaire : acétonitrile-eau, 80-20 v/v) et une colonne de silice greffée « Bondapak » RP 18 (Waters) avec l'éluant : méthanol-acide acétique-eau (70-27-03 v/v) à raison de 1,5 ml/mn (pression : $2{,}7 . 10^3$ psi) en régime isocratique. Un « step gradient » a été développé à partir de l'éluant méthanol-eau, dans les proportions successives : 30-70 (v/v) pendant 10 mn, 50-50 (v/v) pendant 17 mn et 70-30 (v/v) pendant 15 mn.

Les coefficients de corrélation, calculés pour N couples de mesures, sont désignés par (ρ). Les pentes de régression (d) sont calculées par la méthode des moindres rectangles, pour deux variables aléatoires et leurs écarts-types sont donnés par la relation : $\sigma_d = [(d/\rho)^2 - d^2]/(N - 2)$.

Résultats. — Le tableau I montre la composition du liber en dérivés hétérosides. La fraction principale « H19 » contient l'équivalent de 19,3 ± 6,4 nanomoles de glucose par milligramme de poids frais et représente 30,1 ± 9,2 % de l'ensemble des hétérosides (N = 6 échantillons).

TABLEAU I. — Distribution des principales fractions hétérosidiques du liber du pin sylvestre, chromatographiées sur plaques de gel de silice (Merck. 5748) (7) et enregistrées directement à λ = 310 nm pour la détection des phénols, puis à λ = 540 nm après révélation des glucides (9).

Fractions	Rf*	Équivalent en unités glucose (nmoles/mg)	Équivalent en unités phénols (u. i./mg)
H12	0,40	3,4 ± 1,2	6,3 ± 2,1
H13	0,50	2,3 ± 0,8	6,0 ± 2,0
H14	0,54	2,5 ± 0,9	6,2 ± 2,1
H15-1	0,58	3,6 ± 1,3	5,0 ± 1,8
H15-2	0,61	N. D.	6,2 ± 3,1
H16	0,65	7,9 ± 4,5	N. D.
H17	0,73	15,0 ± 8,3	21,0 ± 10,0
H18	0,76	23,0 ± 12,1	44,0 ± 22,0
H19	0,80	26,1 ± 6,4	46,0 ± 11,2
H20	0,83	9,4 ± 3,4	7,0 ± 2,5
H22	0,90	12,3 ± 4,3	25,0 ± 8,7
Digitoxose	0,79	—	

* Coefficients de variation cv $\leqslant$ 0,02; N. D. = non déterminés; U. I. = unités d'intégration des pics (mm^2).

Les deux modes de détection sont en forte corrélation positive : pour N = 9 couples, ρ = 0,966 ($P < 0{,}001$). Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour 6 mesures provenant d'arbres différents.

La figure 1 présente la fraction isolée par CLHP sur colonne de silice greffée du type « amine », puis chromatographiée sur couche mince de gel de silice. Cette fraction hétérosidique est fortement enri-

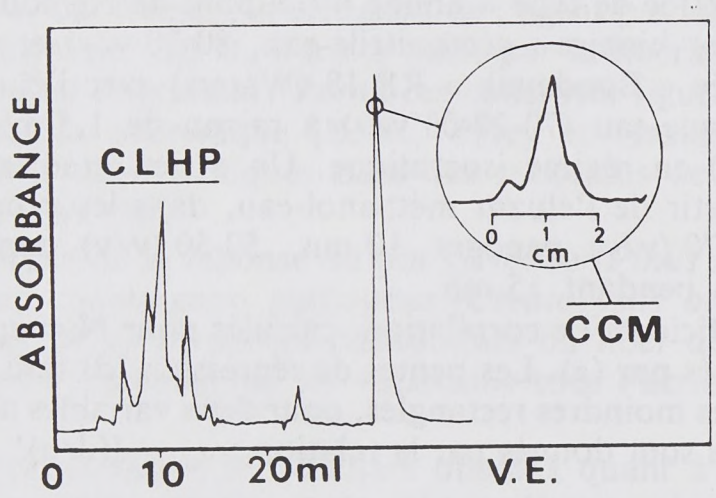


FIG. 1. — Isolement de l'hétéroside H19. Dans le cercle : la fraction obtenue par CLHP sur colonne aminée, puis chromatographiée sur couche mince de gel de silice (CCM) est fortement enrichie en composant H19. VE = volume d'élution (acétonitrile-eau, 80-20, v/v).

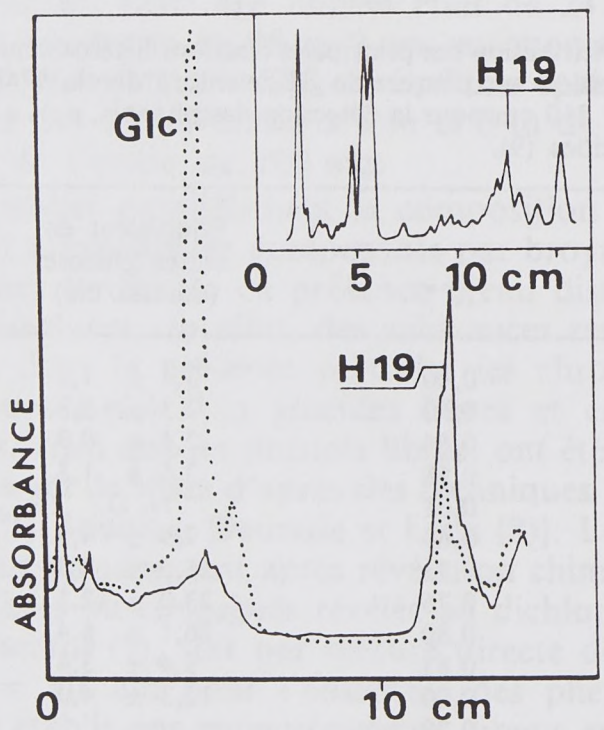


FIG. 2. — Hydrolyse acide de la fraction enrichie en hétéroside H19 : chromatogrammes enregistrés à 540 nm avant (trait plein) et après hydrolyse (pointillés). En encart figure un chromatogramme effectué à partir de l'extrait brut, contenant 22 fractions glucidiques libres et conjuguées (Glc = glucose libre).

chie en composant H19, qui en constitue 70 %, à côté de trois autres constituants résiduels : H17 (7,9 %), H18 (10,5 %) et H2O (11,6 %).

La figure 2 présente l'extrait enrichi en composant H19 par comparaison avec un extrait brut, chromatographiés sur couche mince dans les mêmes conditions. L'hydrolyse acide provoque sa disparition avec libération de

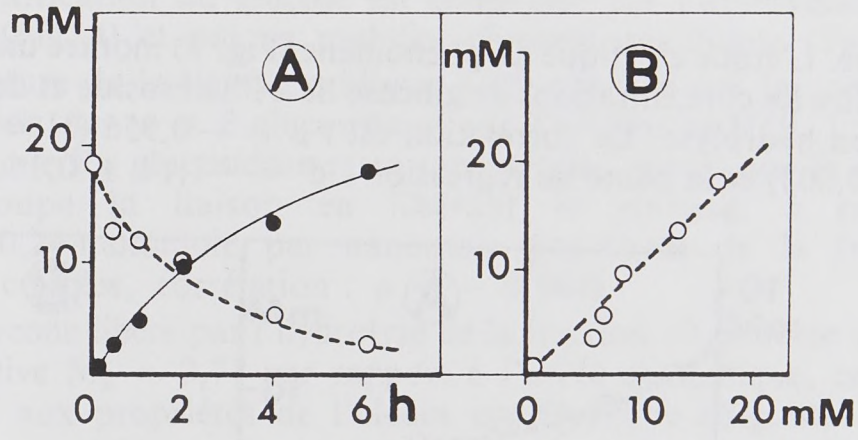


FIG. 3. — Étude de l'hydrolyse acide de l'hétéroside H19 : A : disparition du glucose conjugué (----•----) et apparition du glucose libéré (—— • ——). B : corrélation entre les concentrations respectives du glucose libéré et de celui ayant disparu dans la fraction H19.

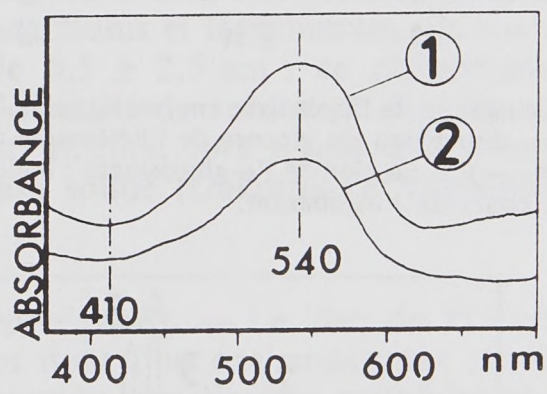


FIG. 4. — Spectres comparés du glucose étalon (①) et du glucose conjugué présent sur l'hétéroside H19 (②), après révélation au naphtyl-éthylène diamine dichlorure.

TABLEAU II. — Mobilités chromatographiques comparées du glucose étalon (Glc), du composant glucidique (x) provenant de l'hydrolyse de l'hétéroside H19, et des deux superposés (Glc + x).

Éluants	Glc	x	(Glx + x)
I	21	18,5	18,5
II	12,5	12,5	—
III	39	37	37
IV	31	33,5	33,5

(I) Acétonitrile-alcool amylique-eau (60-20-20); (II) n.butanol-méthyl-étyl-cétone-ac. acét.-eau (40-30-10-20); (III) n.butanol-éthanol-ac. acét.-eau (40-30-10-20); (IV) n.propanol-eau-pyridine (65-10-25).

Les hauteurs sont exprimées en mm. Quatre solvants différents ont été utilisés sur des plaques de gel de silice. Pour chacun, deux migrations successives de 8 cm et 13 cm ont été effectuées, à une température de 22° C.

glucose. L'étude cinétique du phénomène (Fig. 3) montre une équimolarité entre les concentrations de glucose lié à l'hétéroside et de celui libéré par son hydrolyse. La corrélation est : $\rho = -0{,}956$ (N = 6 couples : P = 0,003) et la pente de régression : $d = -1{,}14 \pm 0{,}16$.

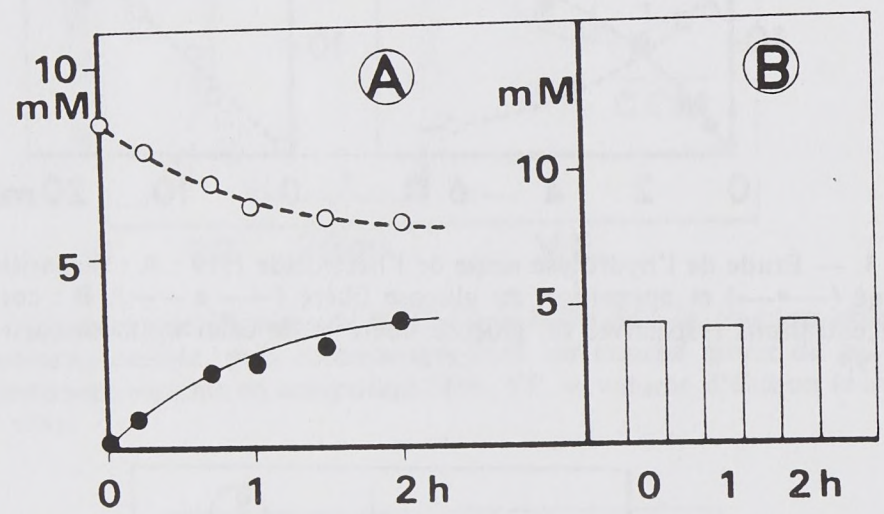


FIG. 5. — Étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la fraction H19. A : action de la β-glucosidase : disparition du glucose de l'hétéroside (---- o ----) et apparition de glucose libre (——•——). B : action de l'α-glucosidase : concentrations du glucose dans l'hétéroside 19, au cours de l'incubation.

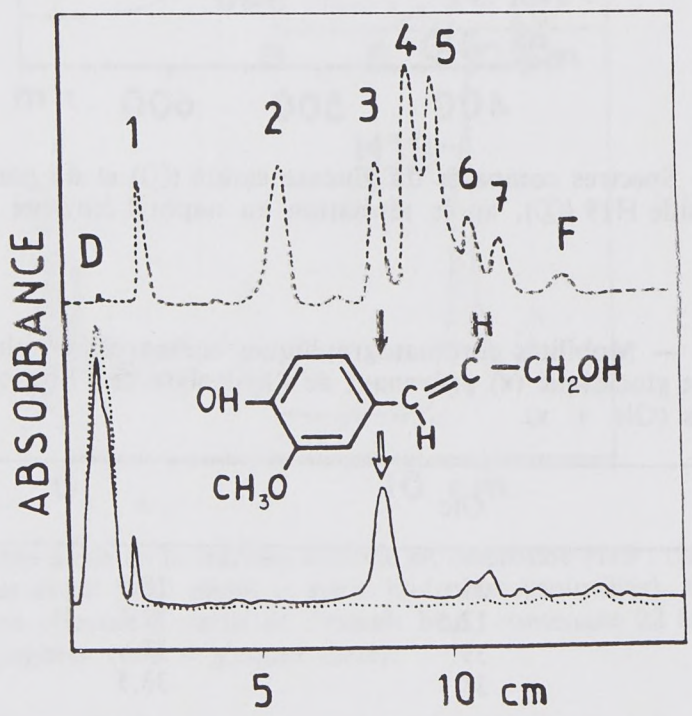


FIG. 6. — Étude chromatographique de l'aglycone libéré au cours de l'hydrolyse de la fraction H19. Graphe du haut : chromatogramme étalon (---) 1 = acide chlorogénique, 2 = acide O.protocatéchique, 3 = alcool coniférylique, 4 = acide caféique, 5 = acide sinapique, 6 = acide vanillique, 7 = acide cinnamique. La formule de l'alcool coniférylique est indiquée en regard du pic étalon correspondant et de celui de l'aglycone 19. Les hétérosides restent sur le point de dépôt (D) : les enregistrements sont présentés avant (. . . .) et après (———) hydrolyse acide. F = front de solvant.

L'identification du glucose est confirmée par l'observation de son spectre (Fig. 4) et par sa mobilité chromatographique (Tableau II).

La nature de la liaison osidique a été précisée par la comparaison de l'action des α et β glucosidases sur l'hétéroside H19. La figure 5 montre que l'α glucosidase reste sans action, tandis que la β glucosidase coupe la liaison en libérant le glucose, à raison de $1{,}20 \pm 0{,}24$ nanomole par nanomole provenant de la fraction 19 ($N = 6$ couples, corrélation : $\rho = -0{,}964$).

L'aglycone libéré par l'hydrolyse de la fraction 19 présente une mobilité relative $M_R = 0{,}71$ par rapport à l'acide cinnamique, ce qui correspond aux propriétés de l'alcool coniférylique (Fig. 6).

Le spectre UV du composé libéré présente des caractéristiques qui coïncident avec celles de l'alcool coniférylique chromatographié à partir d'une solution acide (Tableau III), tandis que l'alcool coniférylique provenant d'une solution neutre présente une légère différence marquée par l'absence d'un minimum à 254 ± 3 nm (Fig. 7). Le spectre étalon et le spectre de l'aglycone sont comparables quant aux écarts d'absorbance entre les maximums et le minimum. Ils sont, par contre, globalement décalés de $6{,}5 \pm 2{,}5$ nm : ce phénomène peut provenir de l'influence de la quantité de substance déposée sur plaque, ce qui a été confirmé, par ailleurs, lors d'une étude des spectres des chlorophylles, en phase solide (Daurade-Le Vagueresse et Bounias, non publié).

Discussion et conclusions. — Le liber du Pin sylvestre contient une série d'hétérosides dont l'un des principaux paraît identifiable, sous réserve de confirmation par d'autres méthodes physico-chimiques, au β glucoside de l'alcool coniférylique. La présence d'un tel constituant paraît d'autant plus plausible que des dérivés β glucosylés de dimères

TABLEAU III. — Caractéristiques du spectre en phase solide de l'aglycone inconnu, provenant de l'hydrolyse acide de la fraction H19 comparées à celles de l'alcool coniférylique provenant d'une solution acide.

Maximums	Alcool coniférylique	Aglycone inconnu
Maximum 1	232 ± 2	226 ± 2
Maximum 2	282 ± 4	275 ± 7
Maximum 3	305 ± 3	301 ± 2
Minimum	254 ± 3	245 ± 2

Les longueurs d'onde sont exprimées en nanomètres et leurs écarts-types sont donnés pour $N = 2$ mesures.

Les écarts constatés (non significatifs : $P > 0{,}15$) sont liés aux décalages vers les longueurs d'onde élevées, sous l'action du traitement acide, et des quantités déposées sur les plaques.

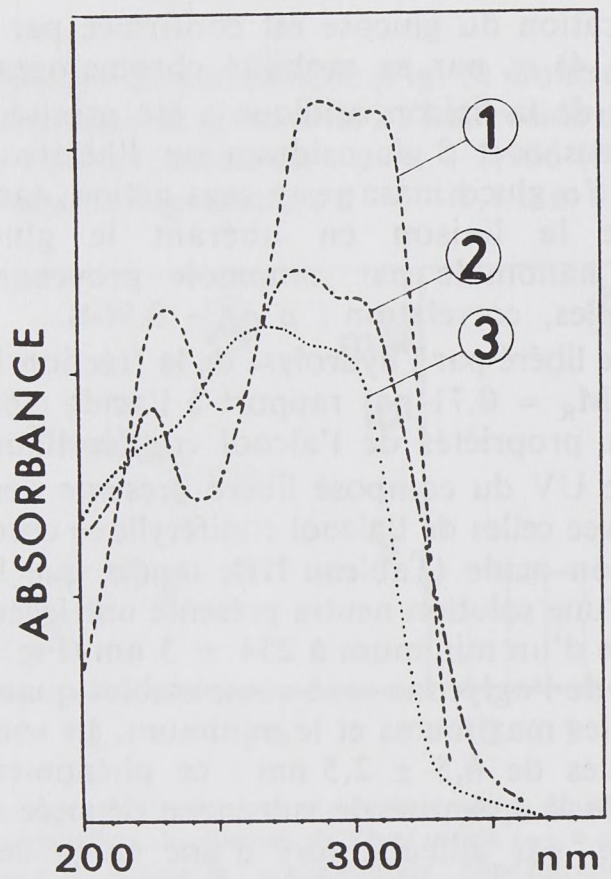


FIG. 7. — Spectres comparés de l'alcool conifé rylique étalon provenant d'une solution acide (①), de l'aglycone inconnu provenant de l'hydrolyse acide de l'hétéroside H19 (②) et de l'alcool conifé rylique d'une solution neutre (③).

du coniférol ont été identifiés dans les aiguilles d'autres conifères, tel que *Picea abies* [Lundgren, Popoff et Theander (11)]. En l'absence de conditions pathologiques, il se pourrait que de tels composés soient doués de fonctions physiologiques particulières, telles que la stimulation de la division cellulaire, sous l'action initiale des cytokinines comme effecteurs primaires [Binns et coll. (12)].

Dans la perspective d'une réponse de l'hôte à l'attaque par un agent pathogène, plusieurs hypothèses méritent d'être prises en considération. En premier lieu, la constitution d'une barrière de lignification exige la synthèse rapide de phénols, suivie de leur polymérisation au niveau de la paroi cellulaire [Matern et Kneusel (13)]. Or, parmi les constituants de la paroi, chez les pins sylvestres, figurent divers glucosides des acides et des alcools hydroxycinnamiques [Shumilin (14)]. Dans ces conditions, la réaction de défense devrait se traduire par une incorporation rapide des hétérosides correspondants, dans les polymères néoformés sous l'action des éliciteurs de résistance introduite par les agents pathogènes.

D'autre part, les phénols peuvent, eux-mêmes, présenter une toxicité élevée vis-à-vis des champignons [Shain et Hillis (15)]. Dans ce cas, l'efficacité de la réaction de défense serait liée à la libération

d'aglycones phénoliques dans le milieu infecté. Woodward et Pearce (16), ayant montré que l'aglycone libre peut, dans certains cas, présenter une toxicité plus élevée vis-à-vis de l'agent pathogène que sous sa forme glycosylée, la disparition de l'hétéroside H19 au profit de la libération d'alcool coniférylique pourrait constituer l'indice d'une réponse spécifique du pin sylvestre à l'infection par *Ceratocystis bruneociliata*. Tel est l'objet de la suite de nos recherches. La composition en phénols libres des arbres sains est extrêmement réduite, ce qui pourrait faciliter la mise en évidence de composés libérés au cours de l'infection, par la comparaison avec la réaction à une simple perforation mécanique non suivie de l'inoculation de l'agent pathogène.

Bibliographie

1. Bell A. A., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1981, *32*, 21-81.
2. Sequeira L., *Ann. Rev. Microbiol.*, 1983, *37*, 51-79.
3. Strack A., Heilemann J. & Klinkott E., *Z. Naturforsch*, 1988, *43c*, 37-41.
4. Beart J. E., Terence H. L. & Haslam E., *Phytochem.*, 1985, *24*, 33-38.
5. Friend J. & Threlfall D. R., *In :* Biochemical aspects of plant-parasite relationships. 1976, Eds London-N. Y.-San Francisco, Academic Press, 354 p.
6. Le Vagueresse-Daurade M. H., Thèse E. P. H. E., 1990, 227 p.
7. Bounias M., *In :* L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. 1983, Masson Editeur, 205 p.
8. Bounias M., Daurade M. H. & Lizzi Y., *Analusis*, 1989, *17* (4), 201-204.
9. Bounias M., *Anal. Biochem.*, 1980, *106*, 291-295.
10. Bounias M. & Daurade M. H., *In :* Coll. « Merck », Paris, oct. 1988.
11. Lundgren L. N., Popoff T. & Theander O., *Phytochem.*, 1981, *20*, 1967-1969.
12. Binns A. N. & coll., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84*, 980-984.
13. Matern U. & Kneusel R. E., *Phytoparasitica*, 1988, *16*, 153-170.
14. Shumilin V., *Khimiya Drevesiny*, 1987, *1*, 105-106.
15. Shain L. & Hillis W.E., *Phytopathol.*, 1971, *61*, 841-845.
16. Woodward S. & Pearce R.B., *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 1988, *33*, 127-149.

3

Séance du 28 Novembre 1990. Société de Biologie de Montpellier

Relations entre paramètres biochimiques et physiologiques associés à la vigueur du Pin sylvestre (*pinus sylvestris L.*)

Marie-Hélène Daurade-Le Vagueresse, Michel Bounias et André Bonaly*

Laboratoire de Biochimie, INRA Avignon BP 91. 84143 Montfavet Cedex.

*Université de Paris X

RESUME : Deux indices physiologiques de vigueur (PGR et WRG), ainsi que la circonférence des troncs, ont été mesurés sur un lot de pins sylvestres agés de 36 à 41 ans et comparés aux concentrations du liber en raffinose, saccharose, glucose, fructose, xylose et glucides totaux. L'analyse factorielle des correspondances a permis de montrer que les deux principales composantes de la variabilite totale sont représentées par la circonférence et par la concentration du liber en saccharose. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les indices physiologiques et biochimiques à l'exception de corrélations négatives entre le raffinose du libert et le PGR, le saccharose et la circonférence, et de corrélations positives entre le glucose ou le fructose du liber et la circonférence. L'analyse typologique a permis de déceler des relations secondaires entre le caractère dominant et dominé et la circonférence ou le saccharose du liber.

Il ne parait donc pas encore possible de définir un indice universel simple de vigueur recouvrant une double signification anatomophysiologique et biochimique.

Key words - Pin sylvestre - vigueur - indice de croissance -

TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1º Résultats nouveaux

Chromatographia, 31, 5-10.

2º- Synthèses : publications "invitées"-

NB- Ouvrage collectif en cours de rédaction -

1°

129

CHROMATOGRAPHIA

An International Journal
for Rapid Communication
in Chromatography and
Associated Techniques

REPRINT

Editors

E. R. Adlard
Burton
United Kingdom

H. Engelhardt
Saarbrücken
Federal Republic of Germany

L. S. Ettre
Norwalk, Conn., USA

G. Schomburg
Mülheim
Federal Republic of Germany

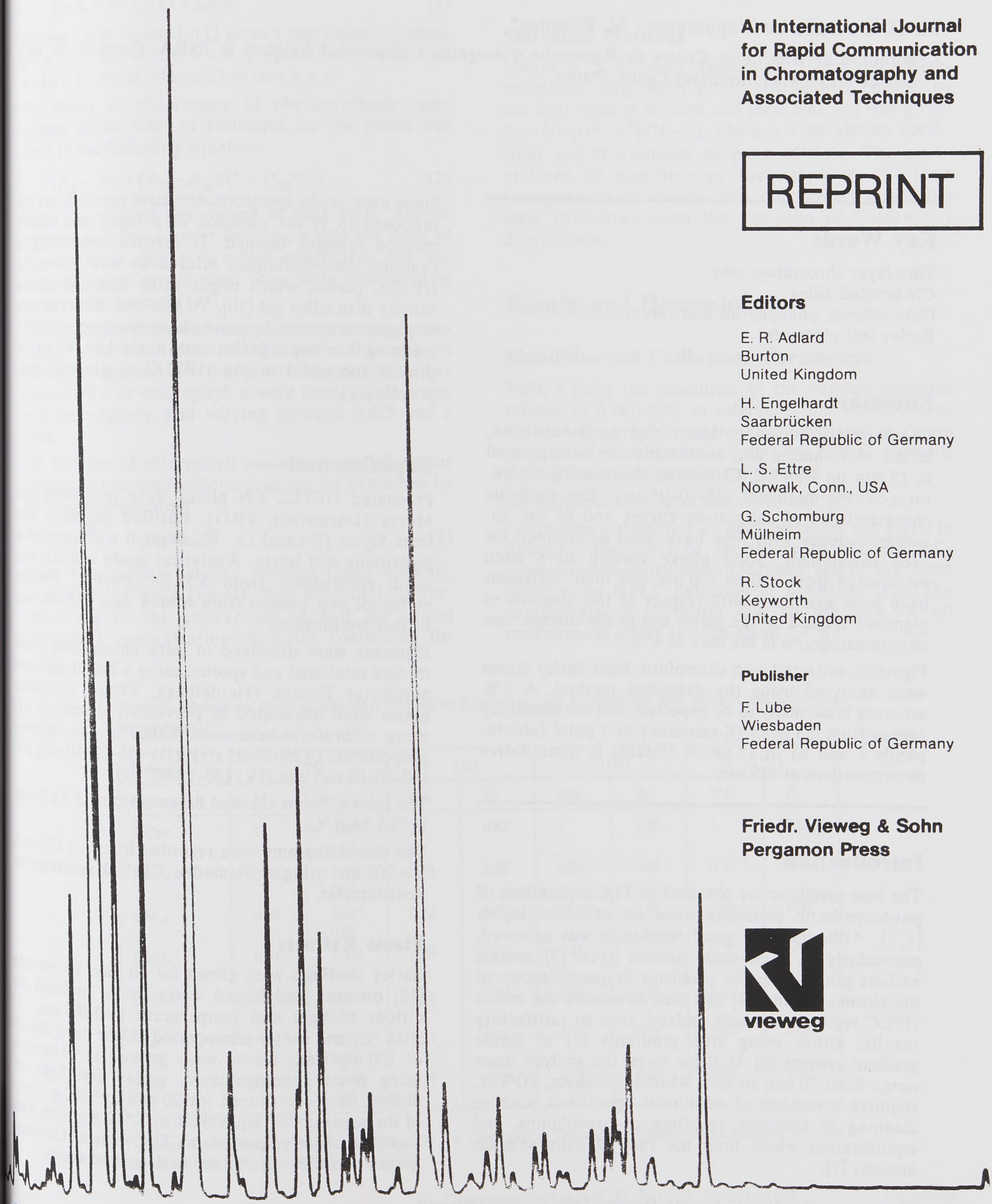
R. Stock
Keyworth
United Kingdom

Publisher

F. Lube
Wiesbaden
Federal Republic of Germany

Friedr. Vieweg & Sohn
Pergamon Press

vieweg



CHROMATOGRAPHIA

Separation, Quantification, Spectral Properties and Stability of Photosynthetic Pigments on CN-Coated HPTLC Plates

M.-H. Daurade-Le Vagueresse / M. Bounias*

Laboratoire de Biochimie, Centre de Recherche d'Avignon, Université d'Avignon & INRA, Domaine St. Paul, P. O. Box 91, F-84143 Montfavet Cedex, France

Key Words

Thin-layer chromatography
CN-bonded silica
Chlorophylls, pheophytins and careotenoids
Barley leaf pigments

Summary

Chlorophylls, phaeophytins a and b, β-carotene, lutein, violaxanthin and neoxanthin can be separated in 15 min on HPTLC, CN-coated sheets using chloroform-hexane-methanol (25–70–05 v/v). The algebraic characteristics of calibration curves and of the absorbance decay with time have been determined for each component. Solid phase spectra have been established from 370 to 700 nm and their variations have been examined with respect to the amounts of pigments spotted on the plates and to the storage time of chromatograms in the dark at 4 °C.

Pigments extracted with chloroform from barley leaves were analysed using the described method. A 5 % accuracy is normally to be expected, and the sensitivity ranges from 0.5 pmol (β-carotene) or 1 pmol (chlorophylls a and b) to 12 pmols (lutein) in quantitative determinations at 425 nm.

Introduction

The best results so far obtained in TLC separations of photosynthetic pigments were on cellulose layers [1, 2]. Although very good resolution was achieved, particularly on home-made sucrose layers [3], several authors pointed out the problems in quantification of the chromatograms [4] and thus advocated the use of HPLC techniques which, indeed, lead to satisfactory results, either using step gradients [5] or linear gradient systems [6]. In these cases, the analysis times range from 20 min to over 45 min. However, HPTLC requires a number of additional operations, such as cleaning of columns, re-filling of precolumns, and equilibration which limit the rate of daily samples analysis [7].

Since even crude spectrophotometric methods are still proposed [8, 9] the question of a rapid and reliable method remains opened. It seemed interesting to examine the possibilities offered by new CN-coated HPTLC plates, which might show less degradation activity than silica gel [10]. To this end, direct analysis of pigments spectra by solid-phase spectrophotometric scanning has been performed, a method which has proved successful in the HPTLC of phenolic compounds [11].

Experimental

Precoated HPTLC CN plates were purchased from Merck (Darmstadt, FRG). Purified pigments were from Sigma (France) i.e.: chlorophyll a, chlorophyll b, β-carotene and lutein. Analytical grade solvents were used: chloroform from S.D.S. (Peypin, France), methanol and hexane from Merck and did not need further purification.

Pigments were dissolved in pure chloroform (4 mM mother solutions) and spotted using a P.S.01 automatic applicator Desaga (Heidelberg, FRG). Chromatograms were developed as previously described [12], using chloroform-hexane-methanol in the following proportions: I (25–70–05 v/v); (II) (65–25–10 v/v); (III) (70–20–10 v/v) and (IV) (80–15–05 v/v).

The solvent fronts reached 8.0 cm within 15.2 ± 0.6 min at 21.5 ± 0.6 °C.

The chromatograms were recorded from λ = 370 nm to λ = 700 nm using a Shimadzu CS 930 spectrophotodensitometer.

Plants Extracts

Barley seedlings were grown for 10 days in test tubes [13] on sand and boiled water under ambient conditions of light and temperature (≈ 1500 lux, 21.5 ± 0.6 °C) and winter photoperiod (11 hr day). Samples of 100 mg fresh leaves were ground in chloroform, using potter homogenizers, under dim light conditions, then centrifuged for 20 min at 5000 g. One µl of the supernatant, equivalent to 1.5–2 mg fresh leaves was immediately spotted on TLC plates. Chromatography was then carried out as described above.

0009-5893/91/1 0005-06 $ 03.00/0 © 1991 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

Linear calibration curves were obtained using the following principle [11]: peaks areas (A) are related to the spot quantities (Q) by an equation of the following form: $A = k \cdot Q^n$ where k is a calibration constant and n an exponent representative of the shape of the curve. Parameters k and n can be deduced from the logarithmic form:

$$\text{Ln } A = n \cdot \text{Ln } Q + \text{Ln } k. \quad (1)$$

Plotting Ln A versus Ln Q gives a regression equation: $y = a + bx$ in which $n = b$ (regression slope) and $a = \text{Ln } k$ (vertical intercept) so that $k = e^a$.

The decay of absorbance of photosynthetic compounds versus time of residence on the plates was fitted to the following equation:

$$(A_0 - A) = (A_0 - A_m)/[1 + (t_{50}/t)^h], \quad (2)$$

where A_0 = initial absorbance at time $t = 0$; A = absorbance at t; A_m = lower limit; t_{50} = time for 50 % of the maximum decay; h = Hill coefficient for absorbance decay versus time. Data were calculated as previously described [14].

Pure phaeophytins were prepared by spotting hydrochloric acid solutions on the pure chlorophylls previously spotted on the plates. 4 nmol of either chlorophyll a or chlorophyll b were treated in this way with hydrochloric acid varying between 0.625 and 2 nmol.

The decrease of chlorophyll concentrations (C) versus amounts (d) of hydrochloric acid can be expressed by the following equation:

$$(C_0/C) - 1 = (d/d_{50})^m, \quad (3)$$

where C_0 = initial amount spotted (here 4 nmol); d = amount of HCl (nmol); d_{50}: dose of HCl corresponding to the conversion of half the initial chlorophyll concentration; m = Hill coefficient for amounts decay. The logarithmic form of this equation allows d_{50} and m to be calculated from linear regression parameters.

Abbreviations: Chl = Chlorophyll; Pho = Phaeophytin; Car = Carotene; Lut = Lutein; Vio = Violaxanthin; Neo = Neoxanthin; A = integration units I.U.; Q = nmol; $k = \text{I.U.}/(\text{nmol})^n$.

Statistical Methods

Means ± S.D. were calculated from (N) determinations. Regression slopes (b) were calculated by the least squares method and their S.D. (σ) was given: $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/(N - 2)$, where ρ = correlation coefficient and N = number of pairs of data. The probabilities of significances associated to "t" tests (comparisons of means and correlation strengths) were calculated from the equation of Student's t distribution.

Results and Discussion

Mobilities and Calibration Parameters

Table I gives the mobilities of the various pigments relative to β-carotene as reference. The resolution of the chromatographic system (I) is illustrated in Figure 1. A resolution similar to that by HPLC methods [15, 16] is thus obtained in a short time.

All pigments were recorded at 425 nm.

Calibration parameters of pure pigments are given in Table II. The limit of sensitivity of the HPTLC-spectrodensitometry determinations are of the same order as by HPLC detection at λ 430 nm [15]. The coefficients of variation due to the sum of all experimental errors average about 5.4 %.

Table I. Mobilities (M_R) of pigments relative to β-carotene and R_f using the four solvent mixtures (see experimental)

Solvent:	(I)		(II)		(III)		(IV)	
Pigments	M_R	R_f *	M_R	R_f	M_R	R_f	M_R	R_f
β-Car	1	0.83[a] ± 0.02	1	0.82	1	0.87	1	0.83
Pho a	0.62	0.51[a] ± 0.05	0.79	0.65	0.69	0.60	0.54	0.45
Chl a	0.49	0.41[a] ± 0.07	0.72	0.59	0.60	0.52	0.40	0.33
Chl b	0.37	0.31[a] ± 0.04	0.59	0.48	0.43	0.37	0.21	0.18
Lut	0.23	0.19[a] ± 0.04	0.52	0.43	0.36	0.31	0.12	0.10
Vio	0.22	0.18[b] ± 0.04	0.41	0.34	0.31	0.27	0.07	0.06
Neo	0.15	0.13[b] ± 0.08	0.39	0.32	0.23	0.20	0.03	0.02

* Means ± S.D. for: (a) ≥ 12 replications; (b) = 8 replications. Others: coefficients of variation < 0.05 for duplicate determinations.

Table II. Calibration parameters of pure photosynthetic pigments on HPTLC CN plates. I.U. = integration units (mm^2); x = 1/n.

	Chl. a	Chl. b	β-Car.	Lut.
M.W.	893	907	536.85	568.85
ρ	0.998	0.999	0.994	0.996
n	0.69	0.63	0.70	0.75
k (I.U./nmol^n)	5.48	5.51	12.34	2.09
h (nmol/I.U.^{x})	0.04	0.066	0.0275	0.375
Limit of sensitivity*				
picomols	1	1	0.5	12
ng	0.89	0.91	0.26	6.8
C.V.	4.7 %	2.7 %	8.3 %	6.0 %

* in quantitative determinations.

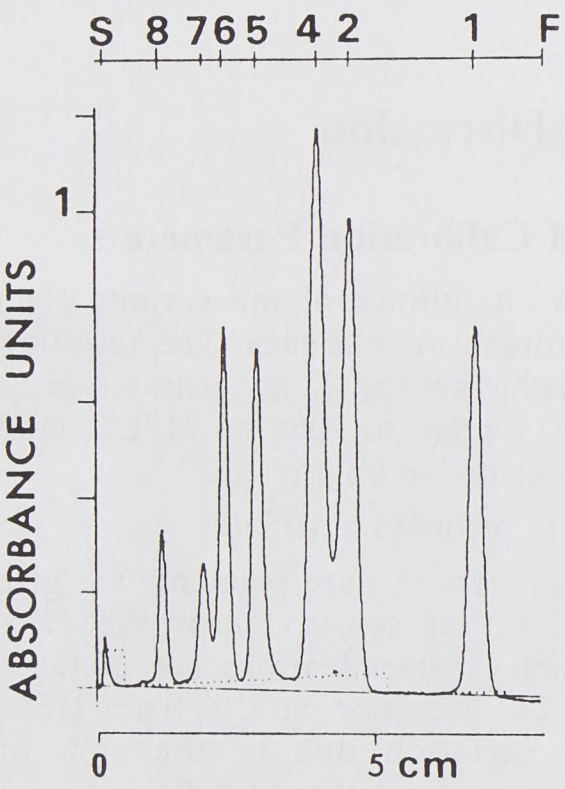


Figure 1

Typical chromatogram of chloroform extract of Barley leaves on HPTLC CN-coated sheets. Solvent I: S = start point. F = front. Spot quantity: equivalent to 1 mg fresh weight. Absorbances 425 nm; **1** = β-Car.; **2** = Pho a; **3** = Pho b; **4** = Chl a; **5** = Chl b; **6** = Lut.; **7** = Vio; **8** = Neo.

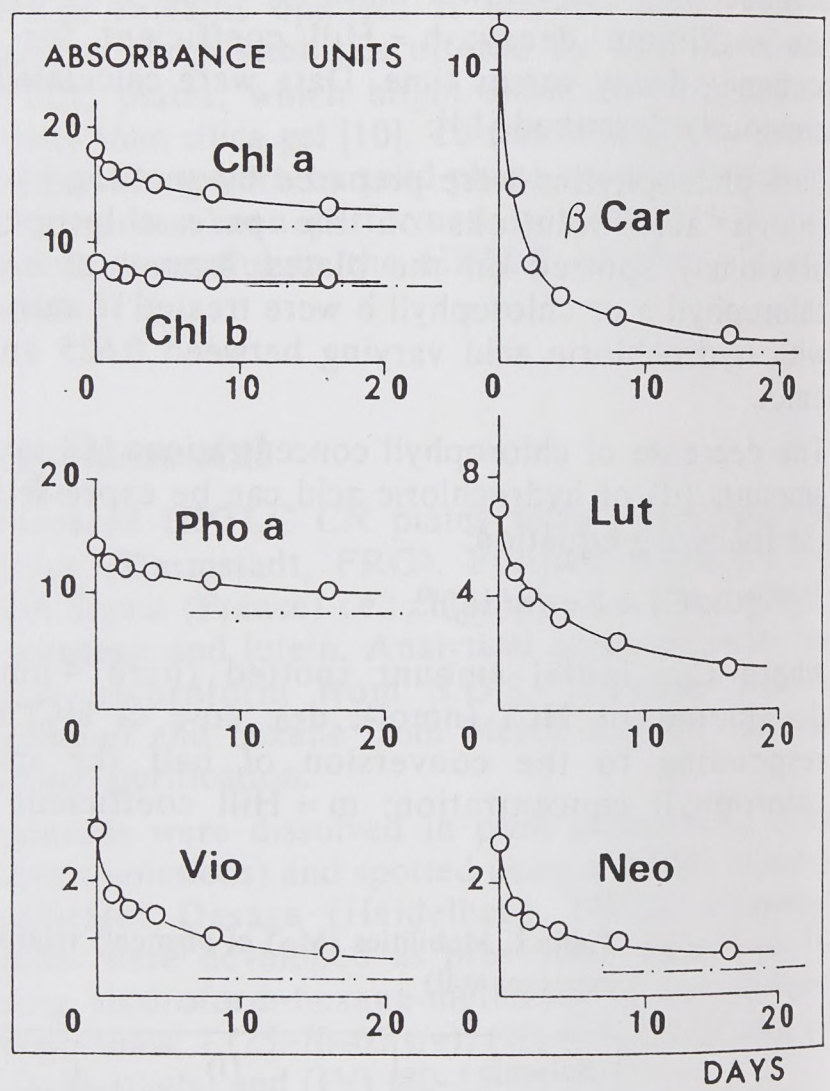


Figure 2

Decay of pigment absorbance (arbitrary units) versus storage time of chromatogram at 4 °C, in dark. Dotted lines indicate calculated lower limits.

Stability of Pigments on HPTLC CN Plates

One of the major problems encountered with silica gel plates was the rapid degradation of chlorophylls and β-carotene immediately after spotting, which was conteracted by the impregnation of plates with glucose as a mild antioxidant [10]. Other searchers sprayed their plates with ascorbic acid for the same purpose [17], but in both cases, this is an additional operation, i.e. a time loss.

Peak areas and absorbance spectra have been monitored on plates kept in the dark at 4 °C. Figure 2 illustrates the data obtained over a long period. The less important decays were observed for chlorophyll b and phaeophytin a, and the most marked ones for carotenoids. The algebraic parameters calculated from the experimental curves including the expected lower limit of absorbance are given in Table III as a percentage of the initial value. The equation allows calculation of the expected loss of pigment absorbance within 30 min, i.e. a time greater than necessary for spotting, developing and scanning the chromatograms. Again this loss is a minimum for chlorophylls and phaeophytins, rather small for β carotene and lutein, and more important (although less than 10 %) for the most polar xanthophyll derivatives.

Table III. Observed decay of pigment absorbance at 425 nm with time.

Pigments	Decay equation			Experimental loss (%) after 30 min
	t_{50}	Min A_m/A_0	h	
Chl a	5.0	63.5 %	0.81	0.36 %
Chl b	2.5	88.9 %	1.5	0.00 %
Pho a	8.6	58.0 %	0.58	1.21 %
β-car	0.9	2.45 %	1.00	2.12 %
Lutein	2.9	0.0 %	0.75	2.3 %
Violax.	1.6	8.5 %	0.59	6.5 %
Neox	1.1	14.7 %	0.58	7.5 %

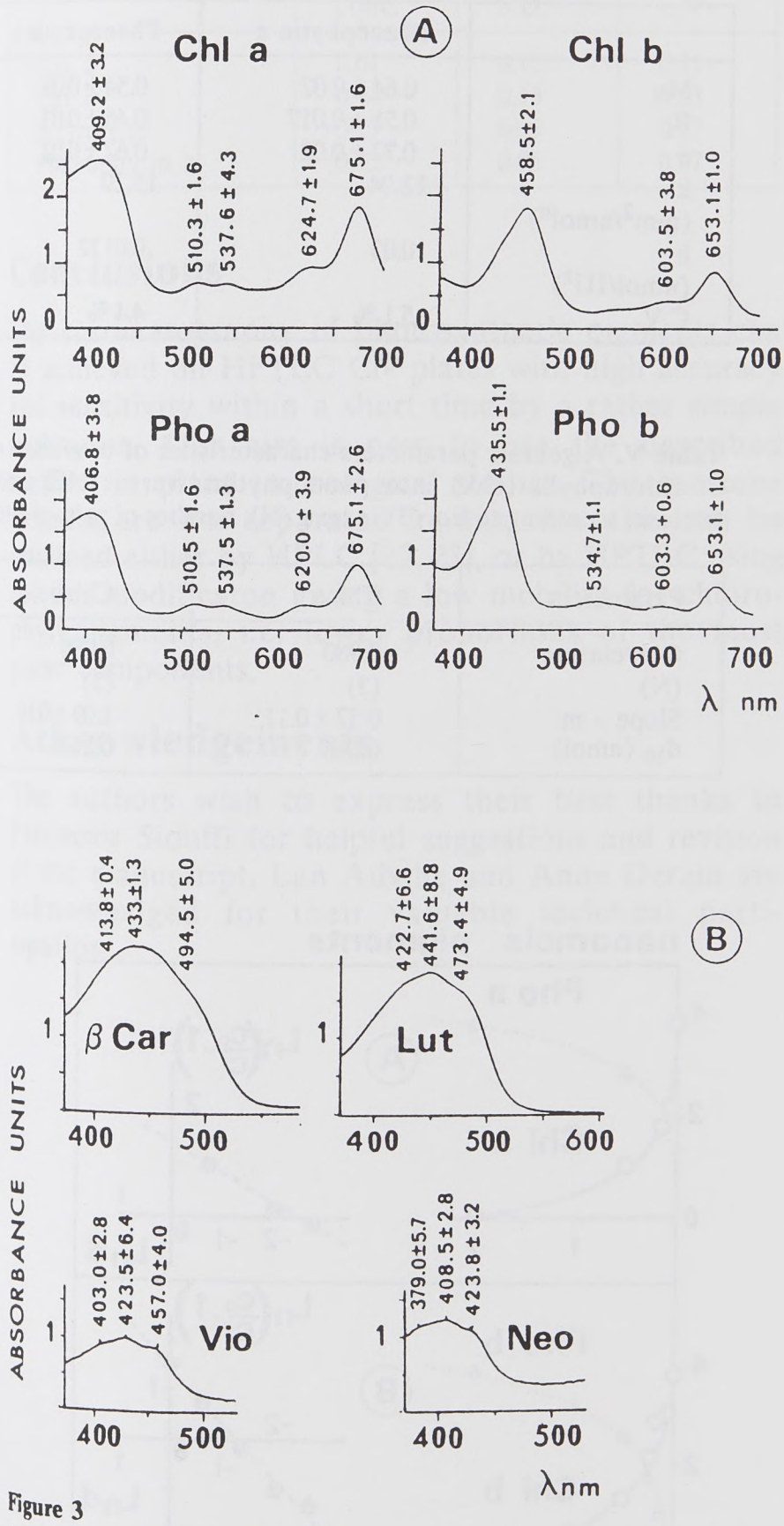


Figure 3
Solid phase spectra of photosynthetic compounds. Mean wavelength values ± S.D. (nm) given for most characteristic maxima, minima and shoulders (N = 4 determinations). A: chlorophylls and phaeophytins. B : carotenoids.

Spectral Characteristics

Figure 3 shows the solid phase spectra of pure chlorophylls and carotenoids. Spectra show some variability according to the pigment concentration spotted on the plates, and also to the level of degradation reached after increasing storage time in the dark at 4 °C.

Figure 4 illustrates the changes in absorbance that were observed according to the spot quantities. No alteration was noticed for the red peaks of chlorophylls which were stable at 674.2 ± 1.6 nm (chl a) (N = 6) and 653.8 ± 0.9 nm (chl b) (N = 6). By contrast, their maxima in the violet-blue region (Soret band) respectively exhibited a decrease from 411 to 405 nm (Chl a) and a very slight increase from 457 to 462 nm (Chl b) from 0.125 to 4 nmol spotted.

Similarly, phaeophytin a exhibited a decrease from 411 to 422 nm and phaeophytin b a very slight variation from 438 to 435 nm, between 0.125 and 4 nmol spotted.

Finally, the maxima of β-carotene and lutein both exhibited a marked shift to longer wavelengths,

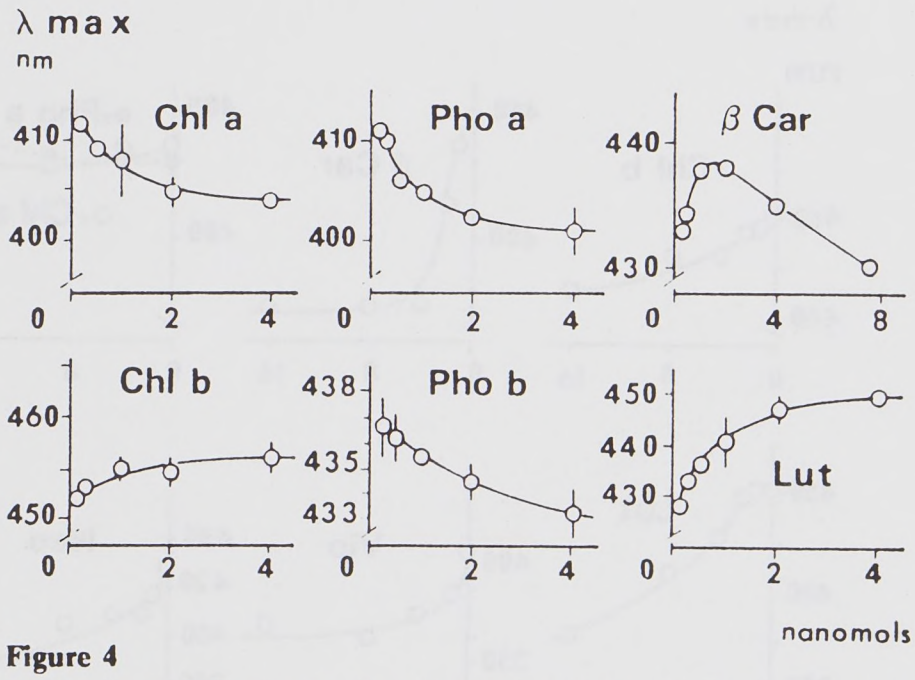


Figure 4
Shifts in solid phase absorbance spectra of photosynthetic pigments, according to quantities spotted (Duplicate determinations).

namely, for β-carotene: from 560 nm at 0.24 nmol to 598 nm at 7.7 nmol and for lutein: from 428.5 nm at 0.125 nmol to 449 nm at 4.00 nmol.

Obviously, the classical laws for reflectance do not hold for the present case. It is likely that some interaction occurs between the stationary phase and the pigments, in the range 400–450 nm. Further experiments would be needed in order to clarify this interesting point.

The degradation of pigments versus storage time results in changes not only in absorbance (Figure 2) but also in spectral characteristics. Figure 5 shows that no alterations are observed for chlorophylls a and phaeophytin a, whereas a shift to shorter wavelengths is observed for the maximum in the Soret region for chlorophyll b and all the carotenoids. The most important variations affect β-carotene and lutein. The observed shifts are partly responsible for the decays of absorbance at 425 nm.

Phaeophytinization of Chlorophylls

The degradation of chlorophylls into phaeophytins by loss of the magnesium nucleus of the molecules remains an important problem specially during conservation of plant samples [19]. The need for quantitative determination of phaeophytins led us to convert standard chlorophylls a and b into their respective phaeophytin forms in order to determine both their comparative chromatographic mobilities and their calibration parameters. This conversion can be achieved in acidic medium [20] and normally results in a shift of the red band to a slightly longer wavelength [21], which is confirmed in our experiments by direct solid phase spectrodensitometry (Figure 3).

Using various HCl concentrations directly applied on the freshly spotted chlorophylls on the plates, resulted in a total conversion, as illustrated by Figure 6. One µl was applied in each case. The rate of chlorophyll conversion into the respective phaeophytins, versus HCl concentration as described by Eq. (3), is characterized by the algebraic parameters given in Table V. Then, the mobilities as determined by comparison with the corresponding chlorophyll forms and the calibration parameters deduced from the

Table IV. Chromatographic and calibration parameters of phaeophytins a and b prepared from respective chlorophylls (N = 6 determinations).

	Phaeophytin a	Phaeophytin b
M_R	0.64 ± 0.02	0.54 ± 0.05
R_f	0.51 ± 0.017	0.46 ± 0.03
n	0.72 ± 0.02	0.62 ± 0.02
k ($mm^2/nmol^n$)	12.04	15.29
h ($nmol/IU^x$)	0.03	0.0132
C.V.	5.1 %	4.4 %

Table V. Algebraic parameters characteristics of conversion rate of chlorophylls (chl.) into phaeophytins, versus HCl concentrations, according to Eq. (3) in text. (N): number of pairs of data.

Parameters	Chl. a	Chl. b
Correlation	0.980	0.988
(N)	(3)	(5)
Slope = m	0.57 ± 0.11	1.09 ± 0.10
d_{50} (nmol)	0.085	0.262

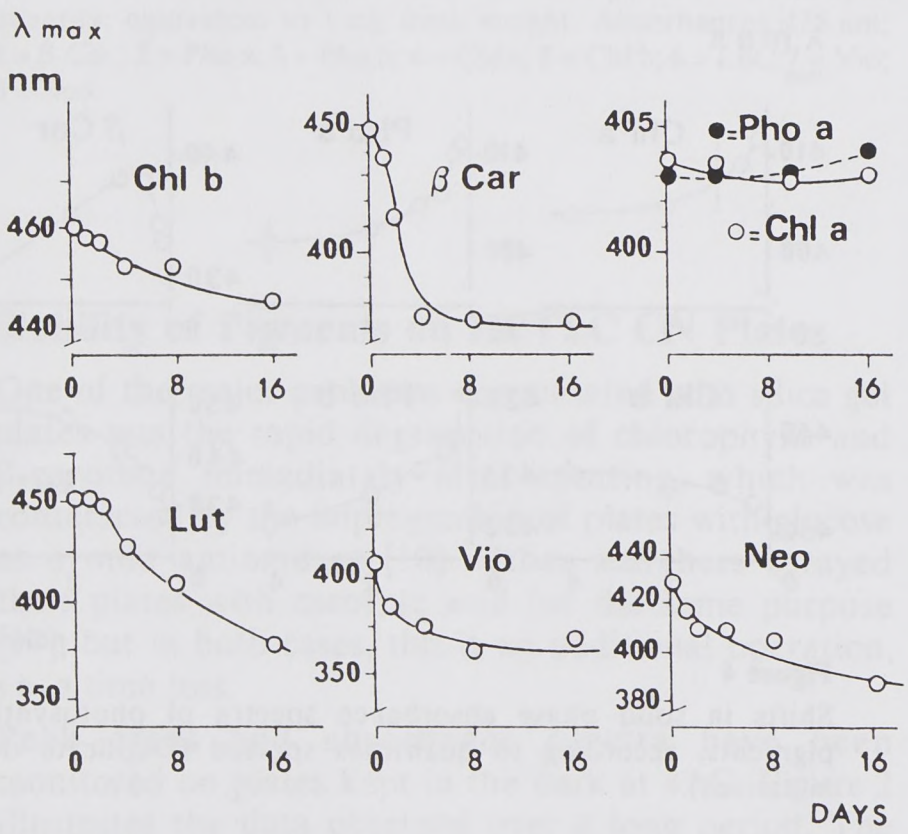


Figure 5
Changes in wavelength of maximum absorbances of solid phase spectra of photosynthetic pigments upon storing plates at 4 °C in dark.

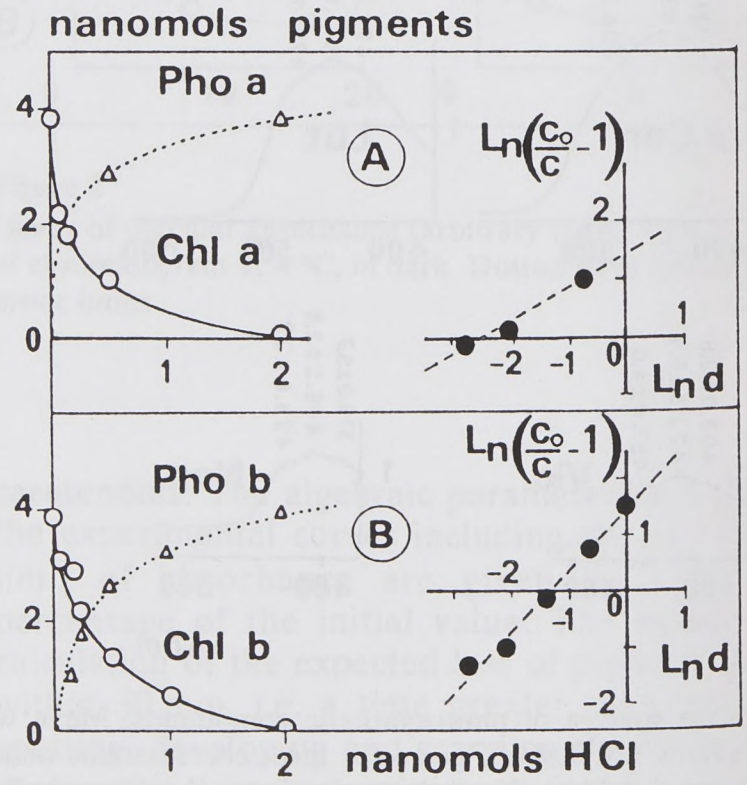


Figure 6
Influence of dose (d) of HCl on conversion rate of chlorophylls (○) into phaeophytins (Δ), on CN plates. Linear logarithmic forms given for chlorophyll disappearance (•). A = Chl and Pho a; B = Chl and Pho b.

actual nanomolar quantities spotted and the peak areas recorded at 425 nm, are given in Table 4. The coefficients of variation from experimental errors average about 4.7 %.

Determination of Photosynthetic Pigments in Barley Leaves

Table VI gives the results obtained using the previously determined calibration parameters.

Table VI. Determination of major photosynthetic pigments in barley leaves. Average concentrations ± S.D. given in nmol · mg^{-1} fresh weight from N = 8 determinations. S.D. = Standard deviations; C.V. = Coefficients of variation.

	conc.	S.D.	C.V.
Chl. a	0.61	0.12	0.21
Chl. b	0.44	0.15	0.33
β-carotene	0.19	0.05	0.27
Phaeophytin a	0.32	0.05	0.27

Conclusions

The chromatography of photosynthetic pigments can be achieved on HPTLC CN plates with high accuracy and sensitivity within a short time by a rather simple technique. Our aim is now to use the described method in plant toxicological studies. The carotene isomers are not separated in this case: this can be obtained either by HPLC [22, 23], or by HPTLC using solvent modificaton giving a low mobility for chlorophyll pigments, i.e. lower proportions of the most polar components.

Acknowledgements

The authors wish to express their best thanks to Professor Siouffi for helpful suggestions and revision of the manuscript. Lan Adville and Anne Derain are acknowledged for their valuable technical participation.

References

[1] *C. K. Wun, W. Litsky,* J. Microbiol. Methods **2,** 265 (1984).
[2] *D. Heimler, M. Michelozzi, V. Boddi,* Chromatographia **28,** 148 (1989).
[3] *I. Shahlberg, P. H. Hynninen,* J. Chromatogr. **291,** 331 (1984).
[4] *S. W. Wright, J. D. Shearer,* J. Chromatogr. **294,** 281 (1984).
[5] *H. W. Paerl, R. A. Lewin, L. Cheng,* Bot. Marina **27,** 257 (1984).
[6] *R. W. Mac Mahon, R. J. Gladon,* Hortscience **19,** 220 (1984).
[7] *E. Hoque,* J. Chromatogr. **448** (3), 413 (1988).
[8] *R. Tica, E. Voina,* Bul. Univ. Brasov. Ser. C. **30,** 87 (1988).
[9] *J. K. Daun, C. T. Thorsteinson,* J. Am. Oil Chem. Soc. **66,** 1124 (1989).
[10] *M. Bounias, M. H. Daurade,* Analusis **17,** 401 (1989).
[11] *M. Bounias, M. H. Daurade,* Analusis **17,** 201 (1989).
[12] *M. Bounias,* L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson, 205 p. (1983).
[13] *M. Bounias,* Arabid. Inf. Serv. (Göttingen) **10,** 38 (1973).
[14] *M. Bounias,* Fundam. Clin. Pharmacol. **3,** 1 (1989).
[15] *M. M. I. Minguez, A. A. Montano, F. J. Garrido, R. B. Gandul,* Grasas Aceites **39,** 363 (1988).
[16] *L. Simon, F. Hajdu, P. Biacs,* Proc. Inst. Conf. Biochem. Sep. **2nd,** 305 (1988) editezd by *J. Pick, J. Vajda,* Hungarian Biochemistry Society Budapest, Hung.
[17] *H. Zonneveld, W. Klop, N. Gorin,* Z. Lebensm. Unters. Forsch. **178,** 20 (1984).
[18] *F. Geiss,* Fundamentals of thin layer chromatography, Hüthig Verlag, 420 (1987).
[19] *J. Abbas, M. A. Rouet-Mayer, J. Philippon,* Lebensm. Wiss. Technol. **22,** 68 (1989).
[20] *T. Watanabe, A. Hongu, K. Honda, M. Nakazato, M. Konno, S. Saito,* Anal. Chem. **56,** 251 (1984).
[21] *J. C. Goedheer,* in: *L. P. Vernon* and *G. R. Seely* (Eds.). The Chlorophylls Acad. Press, p. 147 (1966).
[22] *H. H. Schmitz, W. E. Artz,* J. Chromatogr. **479,** 261 (1989).
[23] *E. Lesellier, C. Marty,* J. High Resolut. Chromatogr. **12,** 447 (1989).

Received: July 24, 1990
Revised manuscript received: Sept. 13, 1990
Accepted: Sept. 17, 1990
C

La quantification des chromatogrammes en couches minces : un procédé général de linéarisation algébrique des courbes d'étalonnage

par MH Le Vagueresse-Daurade et M Bounias *

Les droites d'étalonnage réalisées à partir des surfaces de pics Si correspondant aux quantités Qi d'étalons déposées sur plaques CCM sont de la forme : **Si1/n = h-1.Qi,** ***ou*** **n** ***est un coefficient de forme et*** **h** ***le coefficient d'étalonnage. Ces paramètres permettent de calculer la quantité*** **QX** ***de composé à doser (x) en multipliant par*** **h** ***la surface du pic correspondant à*** **Sx** ***préalablement convertie en*** **(Sx)1/n.**

La CCM présente, sur les autres techniques, l'avantage considérable de permettre à l'analyste d'établir sur un même chromatogramme la courbe particulière d'étalonnage de chacun des composés séparés et identifiés [1]. Les bases théoriques de la CCM quantitative ont été récemment rappelées [2], mais le problème de la linéarisation des courbes d'étalonnage lorsqu'il est traité l'est souvent de manière peu satisfaisante [3]. Nous décrivons, ici, une méthode algébrique généralisable à la transformation de la plupart des courbes d'étalonnage en droites passant par l'origine, selon un principe précédemment ébauché [4].

Si l'on désigne par S_i les surfaces des pics (en unités d'intégration : UI) obtenues avec les quantités Q_i (en nanomoles, par exemple), déposées sur les plaques, les courbes d'étalonnage sont de la forme :

$$S_i = K \cdot Q^n_i$$

où n est un coefficient de forme, fonction de la structure du composé étudié [4] et K une constante. Le coefficient d'étalonnage, h, est celui qui permet de déduire la quantité inconnue, Q_x, de la surface du pic correspondant, S_x, élevé à la puissance $1/n$. Il s'exprime, par exemple, en nanomoles par $(UI)^{1/n}$ et s'écrit :

$$h = K^{-1/n}$$

ce qui correspond à la relation

$$Q_i = h.\ S_i^{1/n}$$

où $S_i^{1/n} = h^{-1}.Q_i$

Les valeurs de h et de n peuvent être déduites du calcul de régression linéaire de $L_n(S_i)$ sur $L_n(Q_i)$ pour chaque substance étalon, soit *(figure 1B)* :

$$L_n(S_i) : n.\ L_n(Q_i) - n.\ L_n\, h$$

où n est la pente de régression et $L_n\, h$ l'abscisse à l'origine.

La *figure 1 (A-B-C)* montre un exemple d'application au dosage du tréhalose, lors de mesures de glycémie de l'abeille.

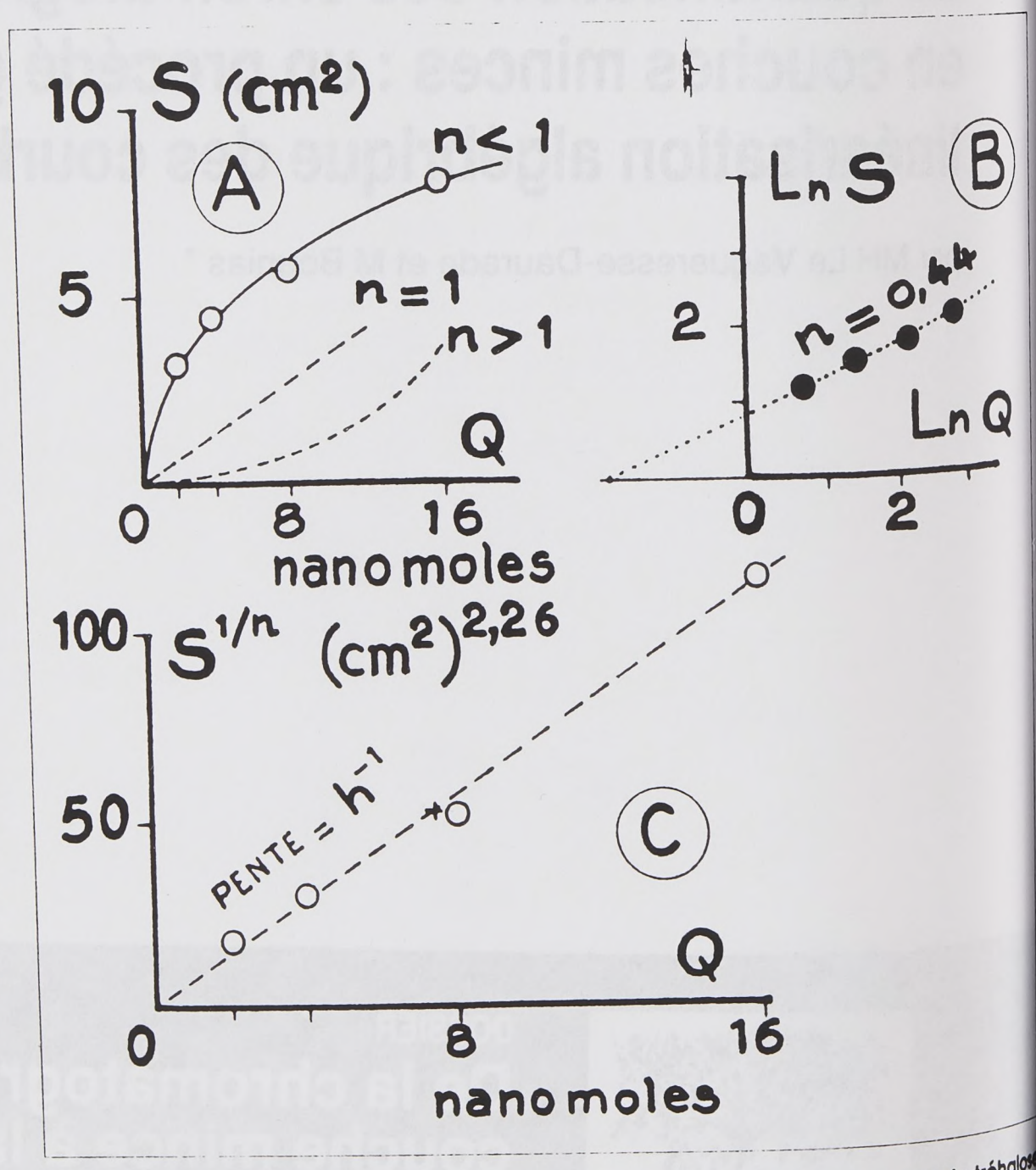


Fig 1 - Les trois étapes de la linéarisation des courbes d'étalonnage : cas du tréhalose révélé chimiquement (4) sur couche de gel de silice (1).
A - courbe directe (en pointillé : les autres cas possibles).
B - transformée bilogarithmique.
C - droite finale d'étalonnage.

Variabilité des paramètres d'étalonnage dans trois cas différents de détection : directe en UV (310 nm) ou visibles (425 nm) et après révélation chimique (540 nm). Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour *n* = 6 mesures indépendantes. CV = coefficient de variation exprimé en %.

Composés :	$h \pm \sigma_h$ (CV en %)	$n \pm \sigma_n$ (CV en %)
Phéophytine (a) 425 nm (direct)	0,03 ± 0,0015 (a) (± 5,1%)	072 ± 0,002 (± 2,8%)
Acide cinnamique 310 nm (direct)	0,06 ± 0,004 (a) (± 6,6%)	0,86 ± 0,01 (± 1,2%)
Tréhalose 540 nm (révelation)	0,152 ± 0,007 (b) (± 4,4%)	0,44 ± 0,007 (± 1,7%)

(a) nanomoles par mm$^{2/n}$. Densitomètre Shimadzu cs 930.
(b) nanomoles par cm$^{2/n}$. Densitomètre Vernon PHI.-5.

À partir de plusieurs courbes réalisées indépendamment sur six chromatogrammes différents, les mesures de la variabilité des paramètres *h* et *n* ont donné les résultats indiqués dans le *tableau* , pour trois cas de détection : enregistrement direct en lumière visible (phéophytine a, λ = 425 nm) ; enregistrement direct en UV (acide cinnamique : λ = 310 nm) ; enregistrement après révélation chimique [4] (tréhalose : λ = 540 nm).

La valeur numérique des coefficients *h* dépend des caractéristiques de chaque densitomètre. Les courbes sont plus homogènes (avec des coefficients de corrélation plus élevés) dans le cas des mesures par réflexion, principalement dans le cas où la pulvérisation d'un réactif chromogène est nécessaire.

Le même procédé est également applicable aux hauteurs de pics, voire à la surface des taches : cependant dans ce cas les valeurs de *n* sont plus faibles [1]. La méthode confère aux extrapolations par valeurs supérieures et inférieures une fiabilité que ne permet pas l'utilisation directe des courbes bilogarithmiques.

Bibliographie

(1) Bounias M (1983) *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince*. Masson, Paris, 205 p.

(2) Treiber L.R (1987) *Quantitative Thin Layer chromatography and its industrial applications*. Marcel Dekker, NY, 353 p.

(3) Geiss F (1987) *Fundamentals of Thin Layer chromatography (Planar chromatography)* Hüthig Verlag, Heidelberg, Basel, NY, 482 p.

(4) Bounias M (1980) Anal Biochem, 106, 291.

* Laboratoire de biochimie, Inra-Avignon, BP 91, 84143 Montfavet Cedex.
Tél : 90 31 60 58.

Une avancée analytique en couche mince : la spectrophotodensitométrie en phase solide

par MH Le Vagueresse-Daurade et M Bounias *

La spectrodensitométrie en phase solide directement réalisée sur chromatogrammes en couche mince conduit à des spectres UV et visibles caractéristiques des composés séparés. Dans le cas de substances absorbant directement en UV ou visible, les spectres sont comparables à ceux établis par spectrophotométrie en phase liquide. Cette technique concourt efficacement à l'identification des composés séparés sur plaques CCM.

La mobilité chromatographique, aussi grande soit son importance, ne constitue qu'un élément d'appréciation pour l'identification d'une substance séparée par chromatographie sur couche mince. Elle est homologue au temps de rétention (pour la technique en phase gazeuse) ou au volume d'élution (pour la technique en phase liquide) [1].

Il est désormais possible, grâce aux performances des densitomètres actuels, de compléter la caractérisation des substances séparées sur couche mince, par leur spectre UV ou visible établi directement sur les plaques. Nous présentons, ici, quelques analogies entre les spectres tracés comparativement en phase solide et en phase liquide.

Plusieurs densitomètres sont actuellement capables de tracer directement les spectres UV ou visibles de composés séparés sur plaques chromatographiques en couche mince (Camag, Desaga, Shimadzu). La *figure 1A* présente le spectre de la chlorophylle (a) pure sur plaque de type cyanure (spectrodensitomètre Shimadzu CS 930), comparé à ceux établis en phase liquide, dans l'éther [2] ou dans l'alcool, après élution à partir de la phase solide (spectrophotomètre Cary 14). La *figure 1B* montre, par comparaison, les spectres établis autrefois, point par point [3] par enregistrement successifs de la même tâche avec une série de filtres monochromatiques (bande passante 10 nm) sur un densitomètre Chromoscan de 1966.

La *figure 2* montre une série de spectres de phénols étalons chromatographiés sur plaque de gel de silice [4] (CS 930), comparés à ceux des mêmes composés mis en solution dans l'éthanol (spectrophotomètre Krontron Uvikon 810).

Enfin, la *figure 3* montre les spectres de quelques glucides révélés au N-(naphtyl)-éthylène-diamine-dichlohydrate [5] sur couche de silice.

Les spectres obtenus en phase solide sont légèrement moins creusés qu'en phase liquide, mais ils présentent des caractéristiques tout à fait analogues, ce qui leur confère un grand intérêt pour

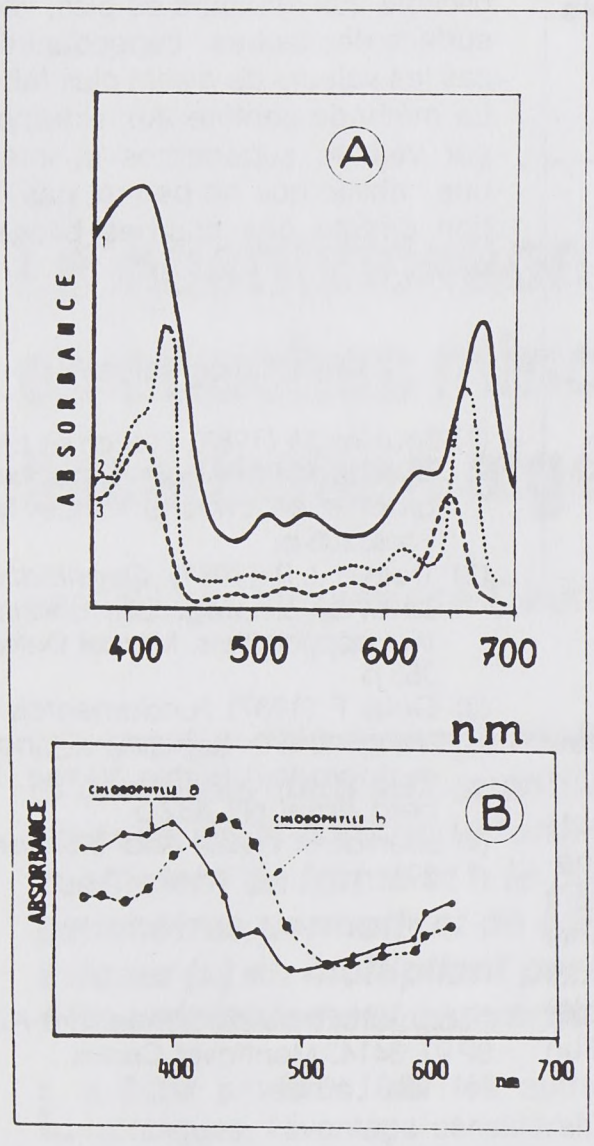


Fig 1 - A : spectre de la chrorophylle (a) phase solide (couche de type cyanure) (1) et en phase liquide : dans l'éther (2) et dans l'éthanol (3).

B : spectres reconstitués point par point sur couche mince d'alumine. Les caractéristiques du photomultiplicateur ne permettaient pas les mesures au-delà de 625 nm.

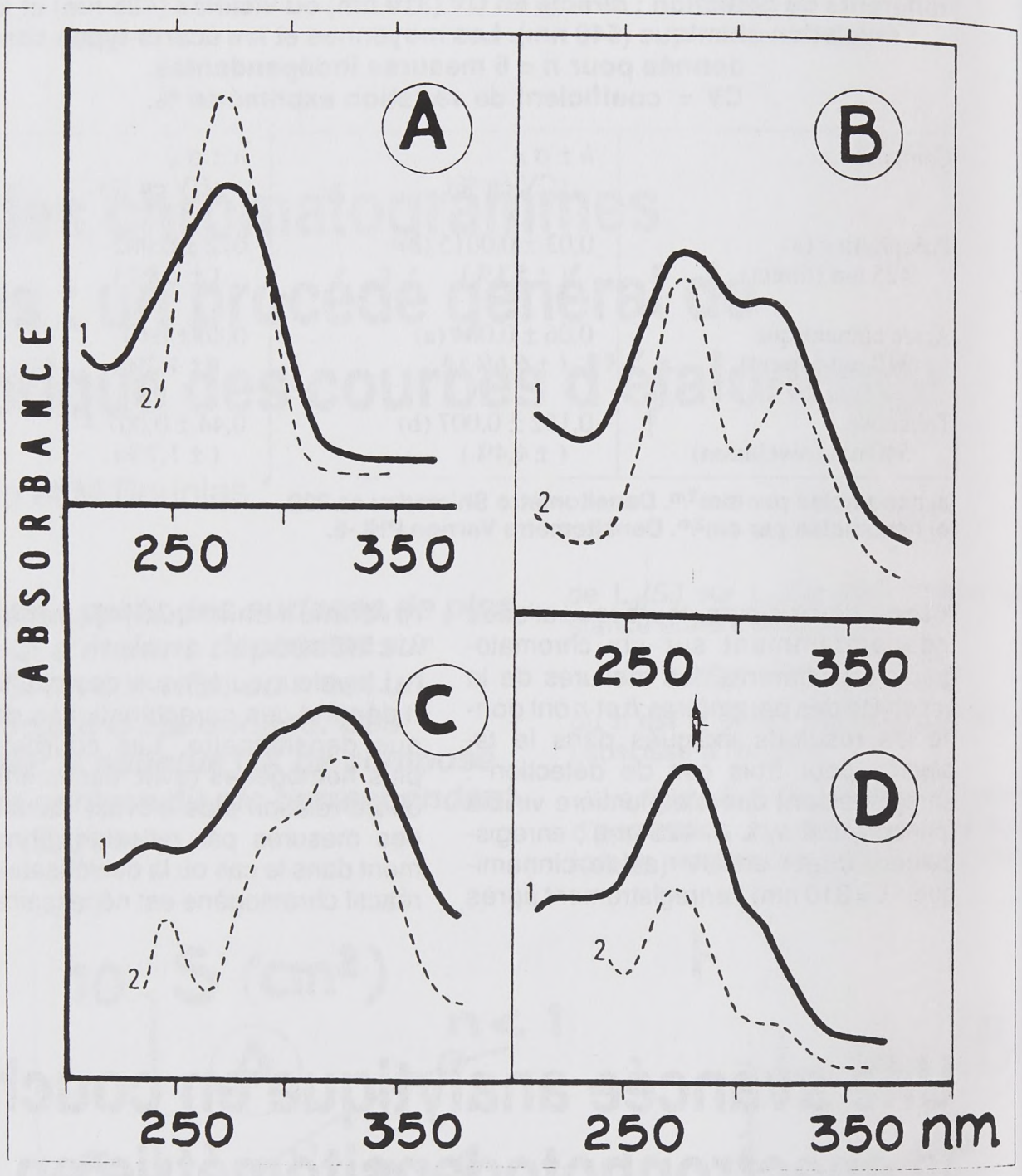


Fig 2 - Spectres comparés de phénols végétaux en phase solide (1) (couche de silice) et en phase liquide (2) (éthanol). A : acide cinnamique. B : acide O.coumarique. C : acide chlorogénique. D : acide m coumarique (on notera la différence observée entre les deux isomères de l'acide coumarique).

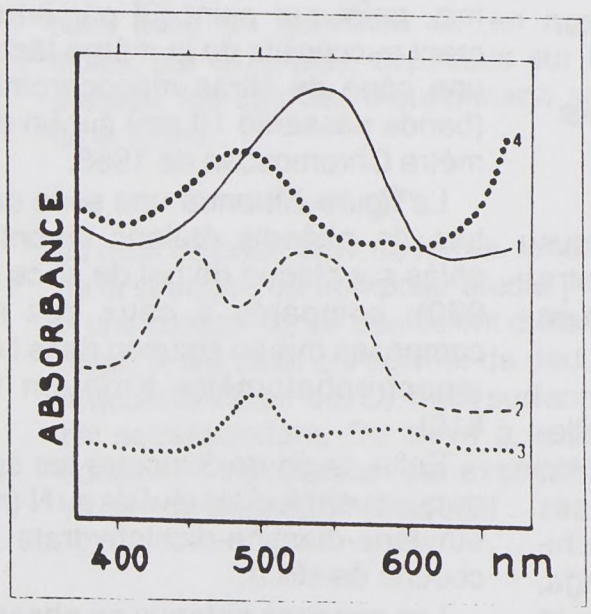


Fig 3 - Spectres comparés de divers glucides révélés au N-Naphtyl-éthylène-diamine-dichlorhydrate;
(1) : glucose. (2) ; rhamnose
(3) : digitoxose ; (4) acide glucuronique.

l'identification des substances séparées. Des décalages peuvent être observés d'une phase solide à une autre, comme cela se produit en phase liquide, dans des solvants différents.

Il est intéressant de souligner que dans le cas d'une révélation chimique le spectre apporte, à la simple observation visuelle, la sécurité d'une mesure objective permettant la caractérisation des structures de glucides pris soit à l'état libre, soit même, encore rattachés à des structures hétérosidiques [6]).

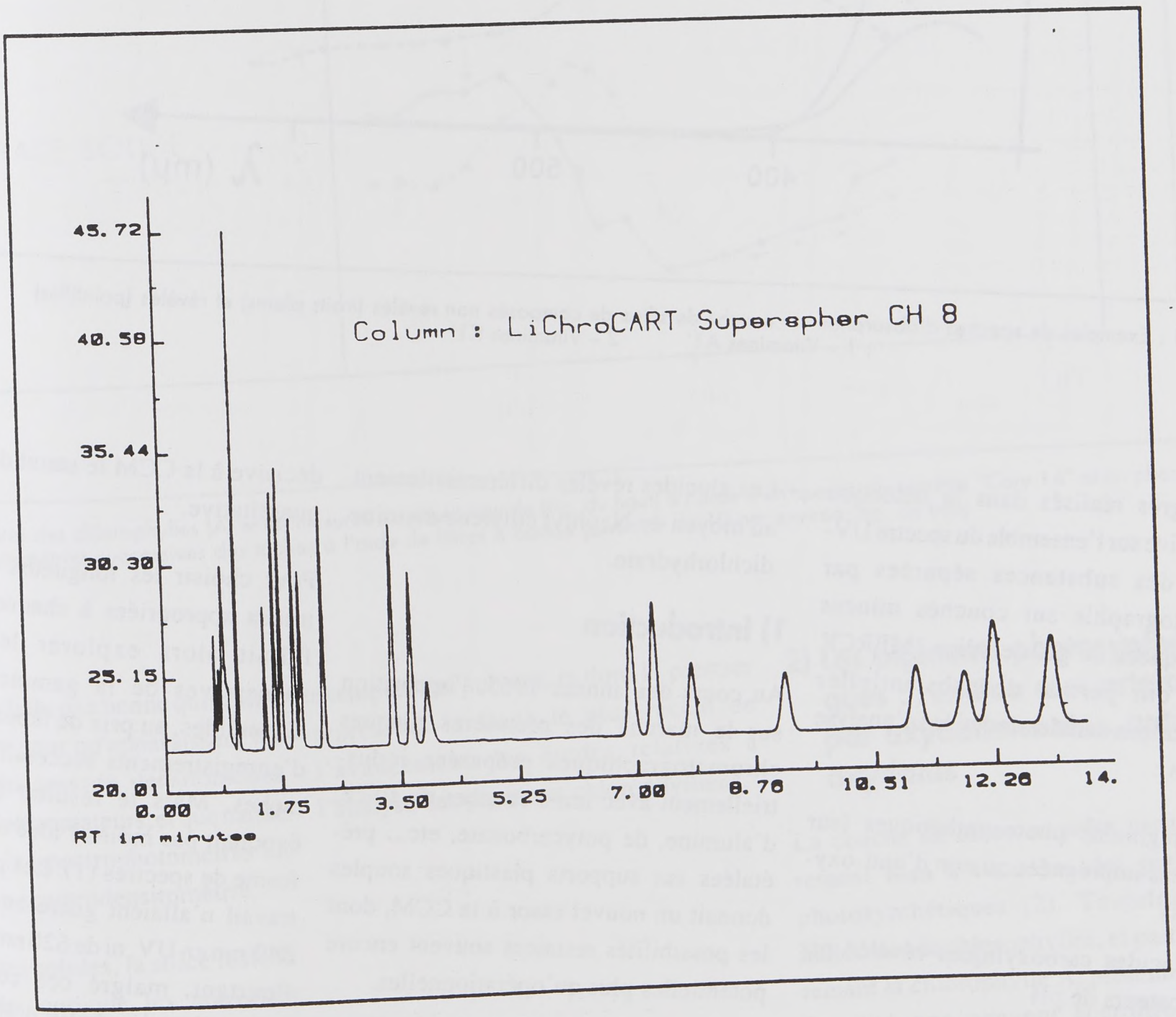
La rapidité des enregistrements de spectres effectués directement, *in situ*, sur les chromatogrammes, jointe à leur capacité discriminative en fonction de la structure des composés séparés font de la spectrophotodensitométrie directe sur plaque un complément analytique extrêmement précieux, certainement appelé à se développer et à se généraliser dans la pratique de la chromatographie en couche mince.

Bibliographie :

(1) Geiss F (1987) *Fundamentals of Thin Layer Chromatography*, Hüthig Verlag, Heidelberg, Basel, NY, 482 p.
(2) Vernon P Seely GR *The Chlorophylls : Physical, Chemical, and Biological Properties*, Academic press NY and London, p 154.
(3) Bounias M (1969) *Chimie analytique*, 51, 76.
(4) Bounias M (1989) , Daurade MH. , Lizzi Y. *Analusis*, 17, 201
(5) Bounias M (1980) : *Anal Biochem*, 106, 291.
(6) Le Vagueresse-Daurade MH (1989) : Colloque international : « Les phénols dans l'environnement », Marseille, 19 et 20 oct. 1989, p. 4.

• Laboratoire de biochimie : Inra-Avignon, BP 91, 84143 Montfavet Cedex.
Tél : 90 31 60 58.

LES CAHIERS De CHROMATOGRAPHIE N° 14



Chromatographie
MERCK

66 Les Cahiers de Chromatographie n° 14 (1990)

M. BOUNIAS – M.H. DAURADE – Y. LIZZI

Développements de la spectrophotométrie en phase solide sur chromatogrammes en couche mince

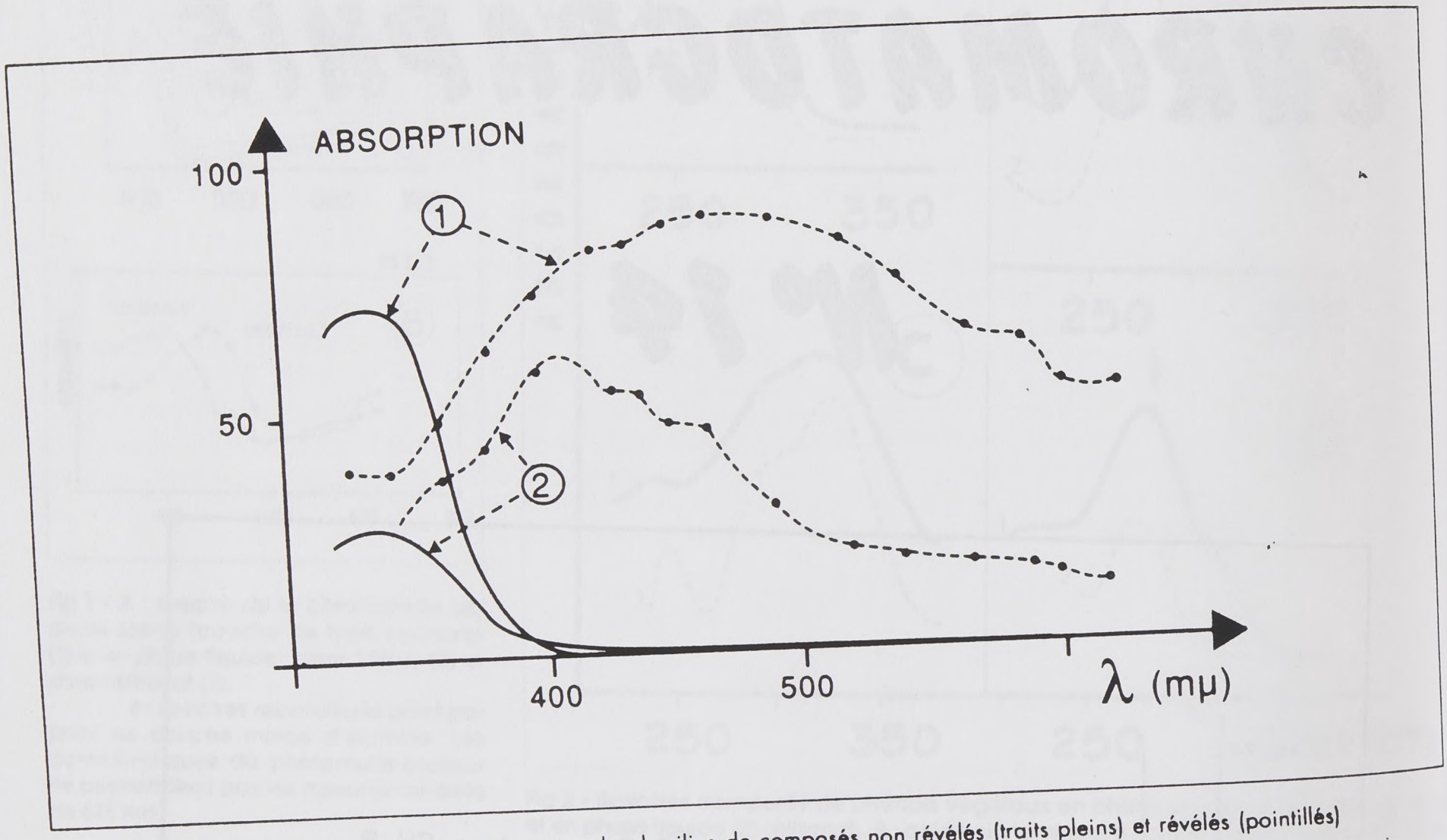


Figure 1 : Exemples de spectres d'absorption sur couche de silice de composés non révélés (traits pleins) et révélés (pointillés)
1 – Vitamines A1' 2 – Vitamines K1'

Les progrès réalisés dans la détection quantitative sur l'ensemble du spectre UV-visible des substances séparées par chromatographie sur couches minces préfabriquées de gel de silice (MERCK 5748), ont permis de substantielles améliorations dans les domaines d'analyse suivants :

- Les pigments photosynthétiques (sur plaques imprégnées ou non d'anti-oxydants)
- Les acides carboxyliques révélés par indicateurs de pH
- Les phénols végétaux analysés directement dans l'Ultra Violet (avec comparaison des spectres obtenus respectivement en phase solide et en
- Les glucides révélés différentiellement au moyen du Naphtyl éthylène diamine dichlorhydrate.

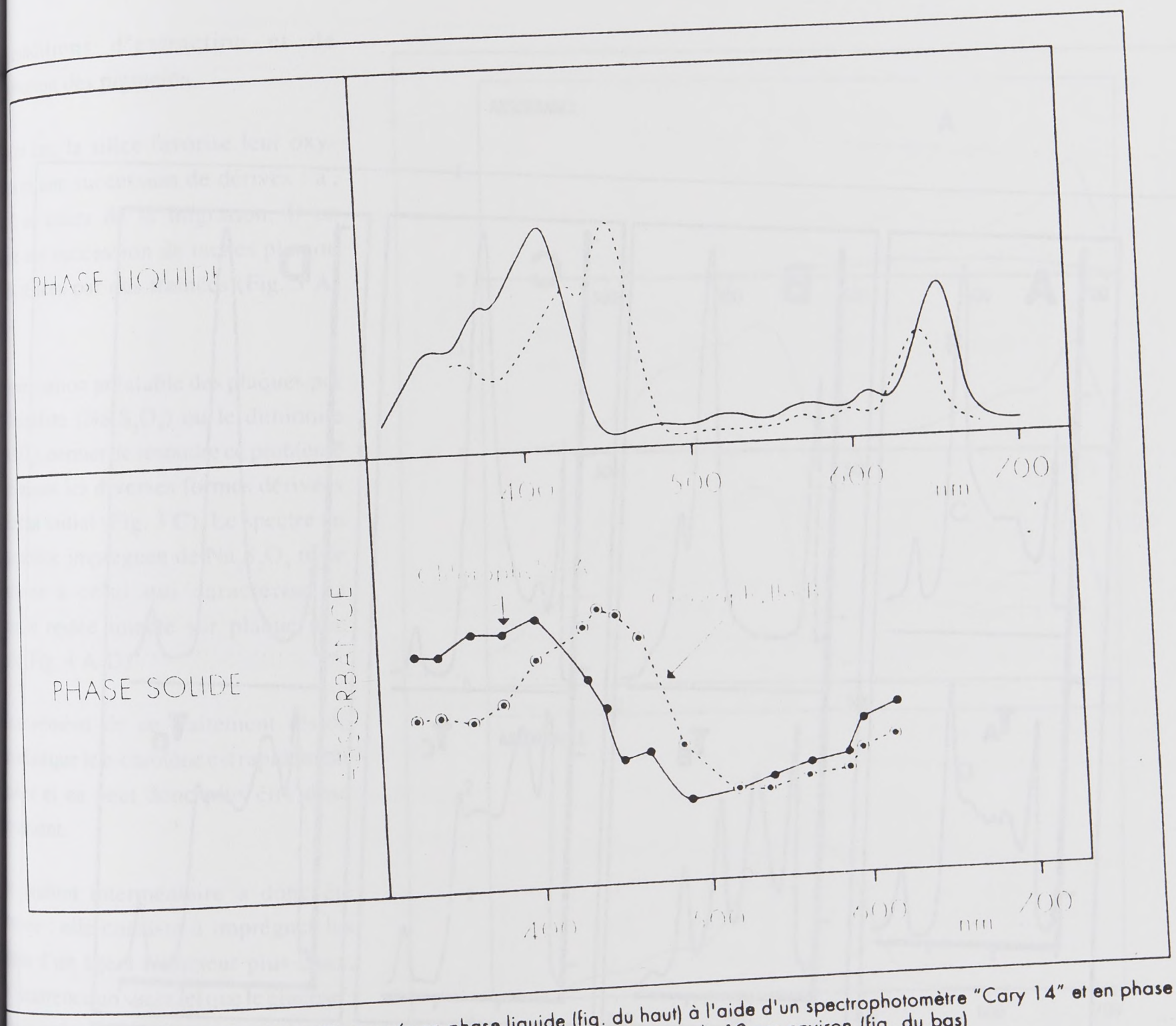
1) Introduction

Au cours des années 1965, l'apparition sur le marché des premières plaques chromatographiques préparées industriellement avec leurs couches de silice, d'alumine, de polycarbonate, etc... prétalées sur supports plastiques souples donnait un nouvel essor à la CCM, dont les possibilités restaient souvent encore potentielles plus qu'opérationnelles.

De nouvelles gammes de densitomètres (en fait, les premières véritablement diffusées en grandes séries) étaient prêtes, parallèlement, à conférer de manière décisive à la CCM le statut de technique quantitative.

Pour choisir les longueurs d'ondes les mieux appropriées à chaque objectif, il fallait alors explorer les réponses successives de la gamme des filtres disponibles, au prix de laborieuses séries d'enregistrements successifs des mêmes taches. Mais le résultat (fig. 1) n'en évoquait pas moins l'idée d'une certaine forme de spectres (1). Les possibilités de travail n'allaient guère au delà de 320-340 nm en UV, ni de 620 nm vers le rouge. Pourtant, malgré ces conditions très artisanales, le profil d'absorbance des chlorophylles sur couche mince (fig. 2 n'était pas sans ressemblance avec le spectre mesuré en phase liquide (fig. 2 B) (1). Entre l'idée et la réalisation

143



ure 2 : Spectres des chlorophylles (A) et (B) mesurés en phase liquide (fig. du haut) à l'aide d'un spectrophotomètre "Cary 14" et en phase ide par densitométries successives des taches à l'aide de filtres à bande passante de 10 nm environ (fig. du bas)

ante, il aura fallu une bonne quinzaine nées encore pour qu'apparaissent les velles générations de densitomètres pés de monochromateurs, et que naisse tablement la spectrophotométrie en se solide ou spectrodensitométrie.

mi les phases solides, la silice reste la s employée, quoique les nouvelles ases inverses soient appelées à en ndre progressivement la relève. Il raissait donc utile de lui consacrer les exemples qui suivent, et dont le premier représente le stade le plus récent de l'avancement des études relatives à l'analyse des pigments chlorophylliens.

2) Les pigments photosynthétiques : remède aux artefacts par oxydations et ... anti-oxydants

La couche de silice se prête particulièrement bien à l'analyse des pigments photosynthétiques (2). Toutefois, les molécules de chlorophylles, et particulièrement la chlorophylle A, présentent une fragilité que peuvent accroître l'état physiologique de la plante aussi bien que

144

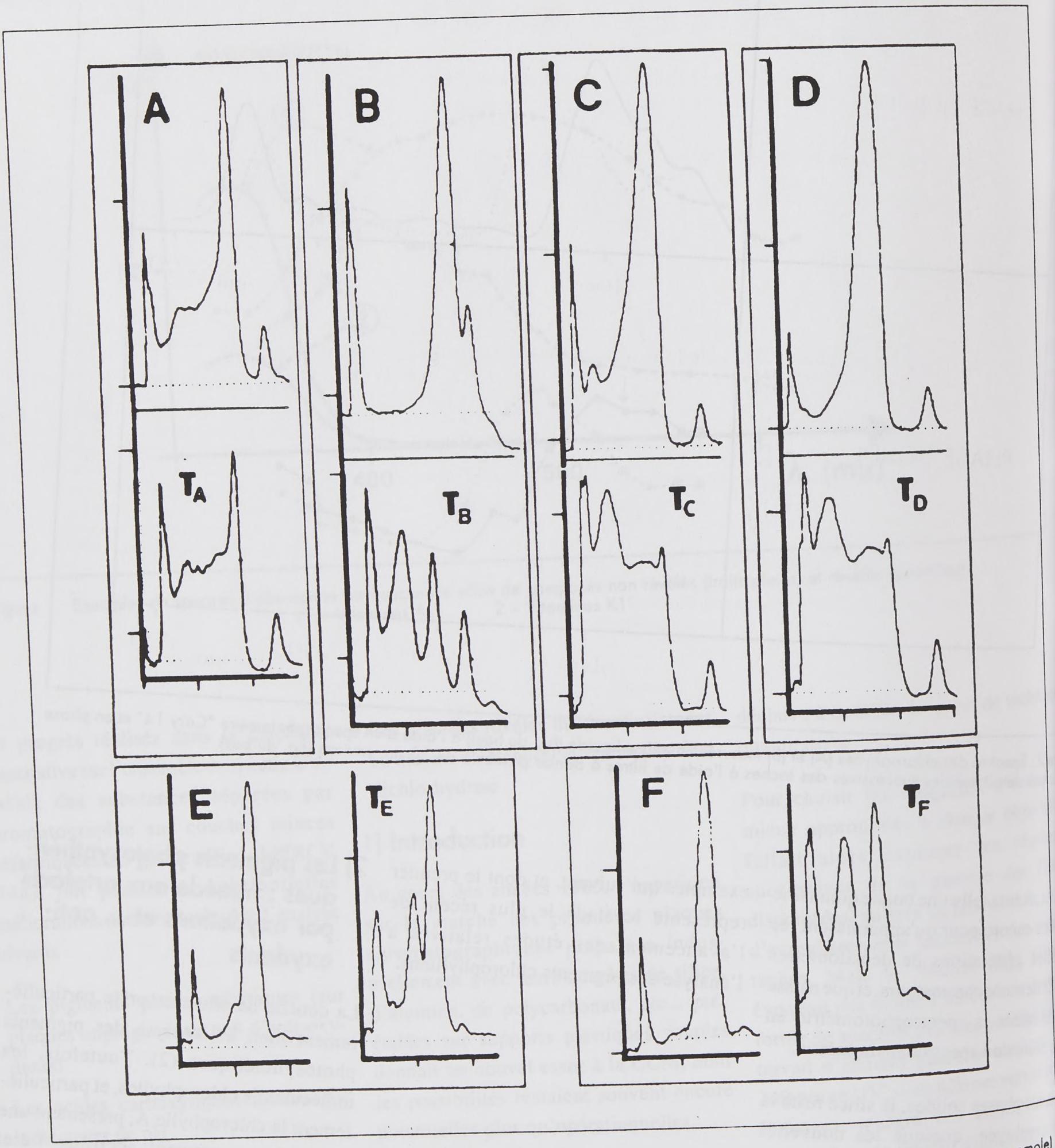


Figure 3 : Effets qualitatifs des agents réducteurs sur la distribution des formes moléculaires des chlorophylles (0,8 nanomole) chromatographiées sur gel de silice
Chlorophylle (a) : A = Glc 1 mM ; B = Glc 125 mM ; C = thiosulfate 2,5 mM ; D = thiosulfate 20 mM
Chlorophylle (b) : E = Glc 1 mM ; F = thiosulfate 10 mM
T = témoins correspondants sur plaques non traitées

145

conditions d'extraction et de servation des pigments.

s ce cas, la silice favorise leur oxy- on en une succession de dérivés : a', b', au cours de la migration. Il en lle une succession de taches plus ou ns reliées par des traînées (Fig. 3 A-

mprégnation préalable des plaques par thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) ou le dithionite $a_2S_2O_4$), permet de résoudre ce problème éduisant les diverses formes dérivées eur état initial (Fig. 3 C). Le spectre en se solide imprégnée de $Na_2S_2O_3$ reste nforme à celui qui caractérise la lécule restée intacte sur plaque non tée (Fig. 4 A-D).

nconvénient de ce traitement réside s le fait que le b-carotène est rapidement coloré et ne peut donc plus être dosé ectement.

e solution intermédiaire a donc été posée : elle consiste à imprégner les aques d'un agent réducteur plus doux, l'occurrence un sucre tel que le glucose : lui-ci présente à la concentration de 5 nMole, une efficacité réductrice isfaisante (fig. 3 D) qui préserve alement le spectre de la molécule g. 4 B) (3).

ans ces conditions, la coloration du ß- rotène est préservée et son spectre ésente un aspect tout à fait normal g. 5).

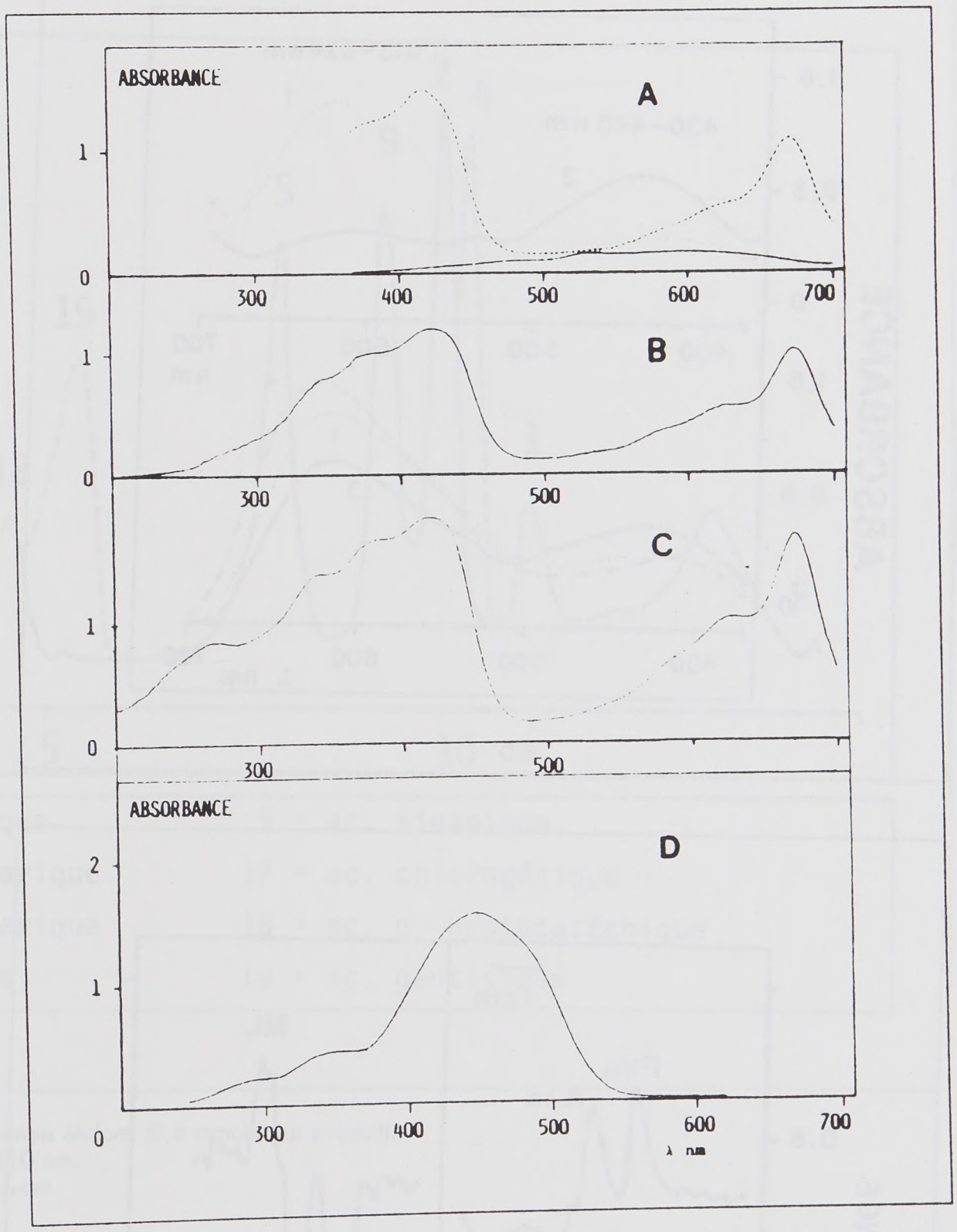


Figure 4 : Spectres UV/visible en phase solide (gel de silice) de la chlorophylle A sur plaques imprégnées de tampon phosphate pH 6,8 (A), de glucose 10 mM (B) ou de thiosulfate de sodium 20 mM (C), et du ß-carotène sur plaques imprégnées de glucose 10 mM (D)

3) Les acides carboxyliques : renouveau des indicateurs de pH comme réactifs quantitatifs

Lors de récentes recherches sur deux diacides gras à courtes chaînes, identifiés comme hormones de survie de l'abeille (4), les difficultés d'analyse de ces composés ont justifié le recours aux indicateurs de pH comme réactifs de révélation post-CCM.

Les spectres comparés des zones basiques et acides, après révélation au vert de bromocrésol (fig. 5-1 et 2) montrent

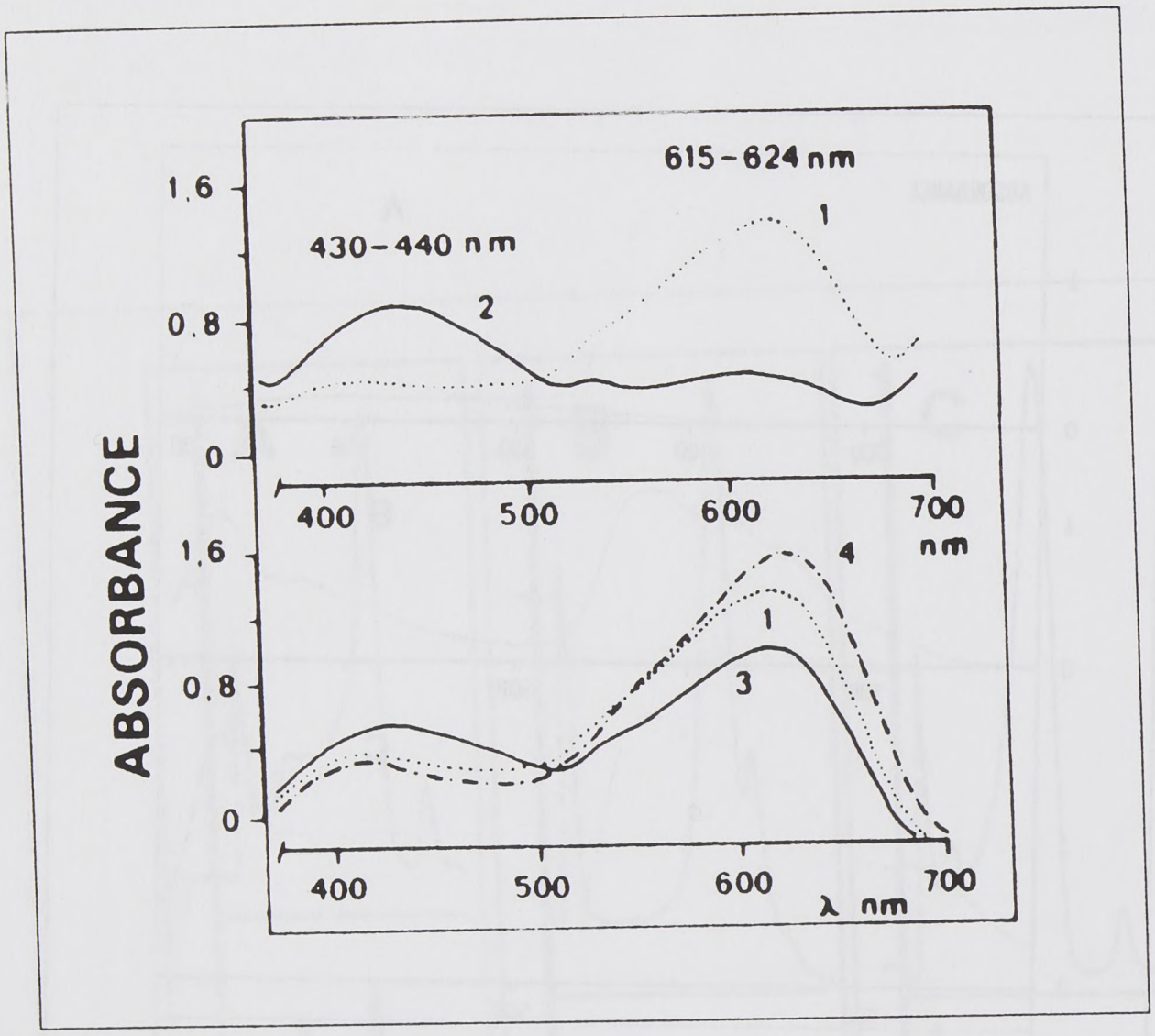
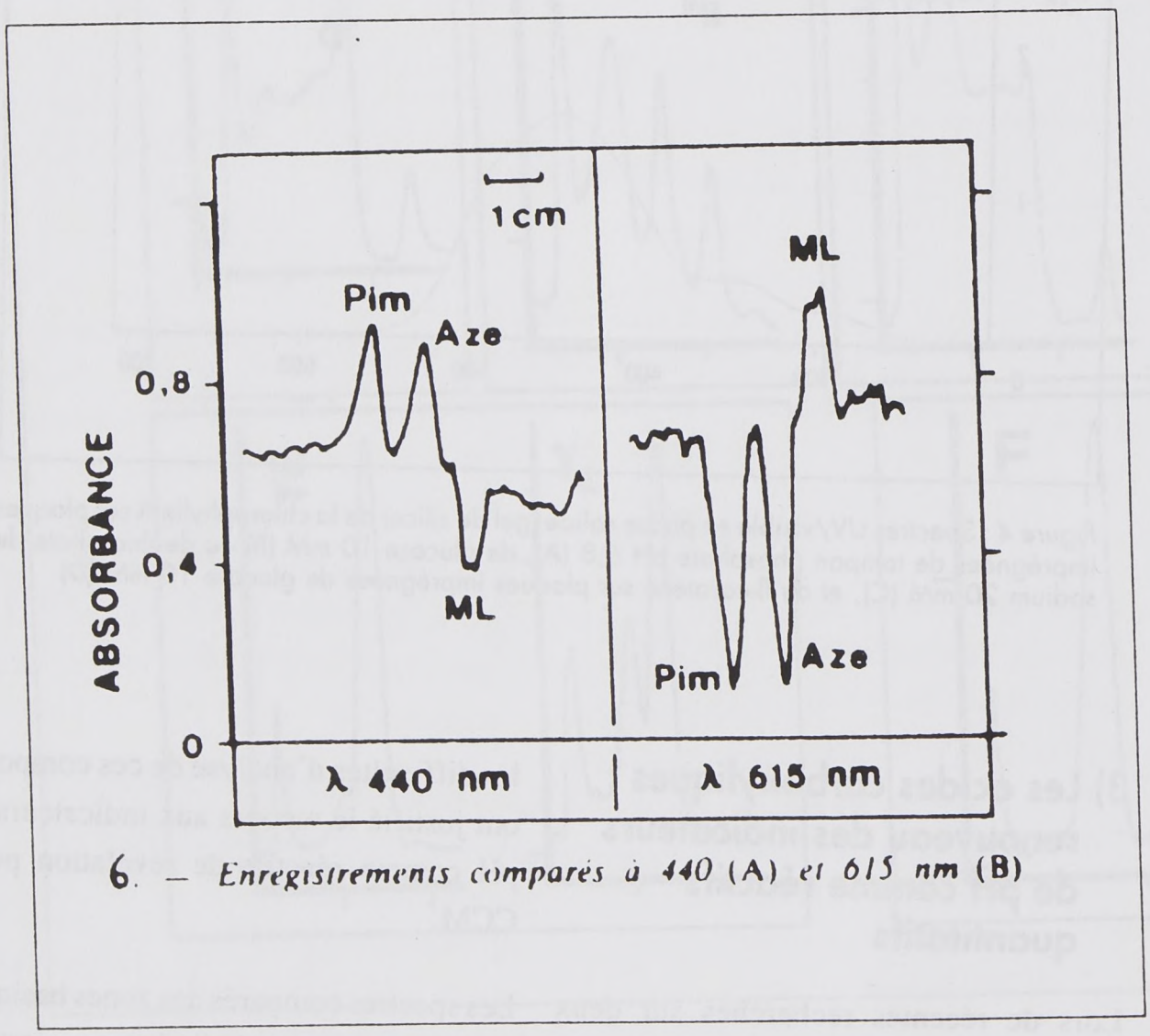


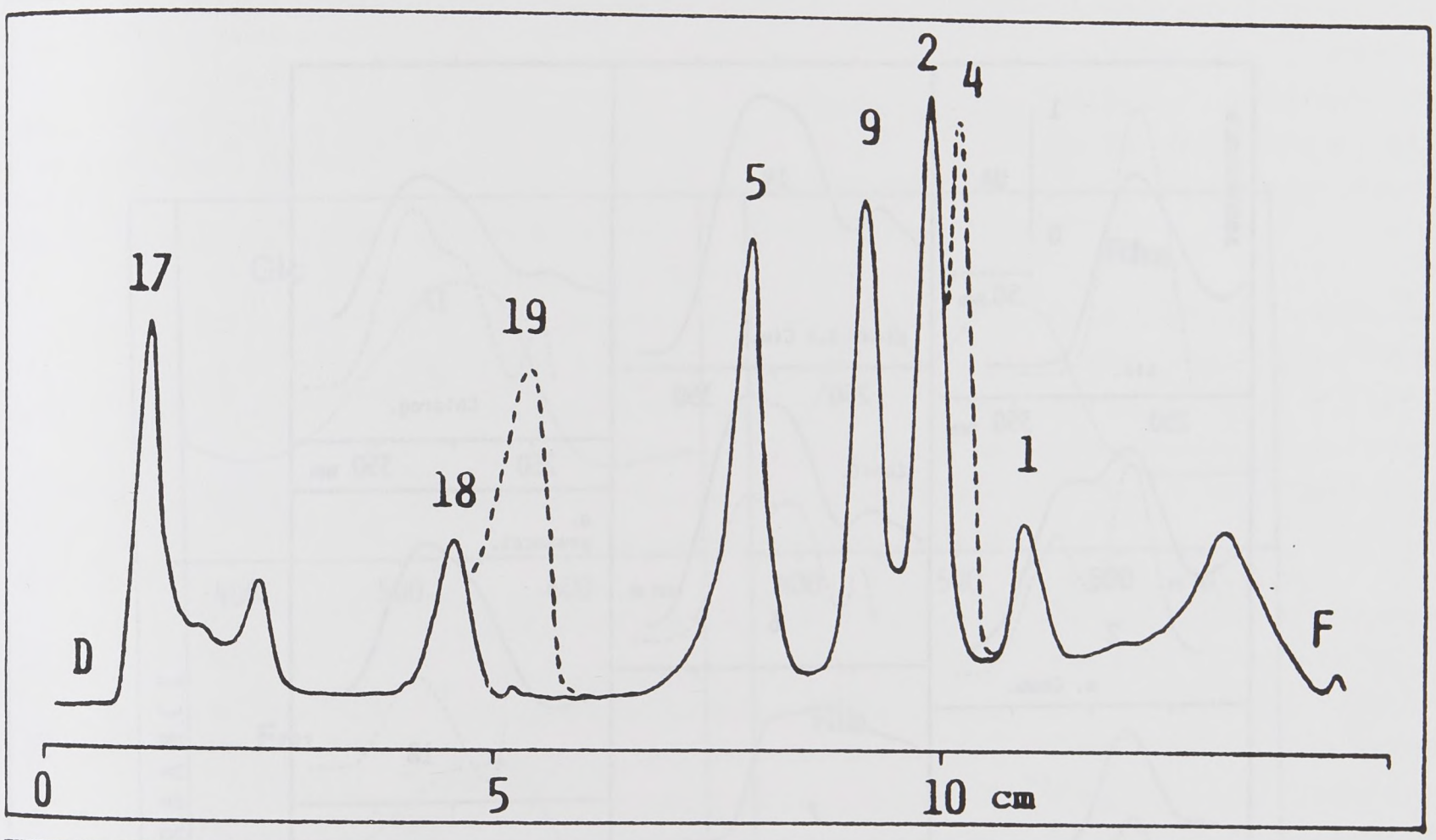
Figure 5 : Spectre d'absorption comparé du fond de plaque (1), d'une zone fortement acide (2), de l'acide azélaïque (3) et de la mono-laurine (4) sur couche mince de gel de silice après pulvérisation de vert de bromocrésol suivie de chauffage.



6. — *Enregistrements comparés à 440 (A) et 615 nm (B)*

Figure 6 : Enregistrements comparés à 440 (A) et 615 nm (B) de chromatogrammes sur couches minces de gel de silice des acides azélaïque (Aze) et pimélique (Pim) ainsi que d'un liquide neutre : la mono-laurine (ML).

147



1 = ac. cinnamique	9 = ac. sinapique
2 = ac. o. coumarique	17 = ac. chlorogénique
4 = ac. p. coumarique	18 = ac. o. protocatéchique
5 = ac. caféique	19 = ac. gentisique

Figure 7 : Chromatogramme d'une série de phénols étalons (0,8 mmole par produit).
Enregistrements photométriques directs à λ = 310 nm.
D = point de dépôts ; F = front supérieur de solvant.

une différenciation est possible sous erve d'effectuer les enregistrements aux gueurs d'ondes caractéristiques, soit 0-440 nm pour les zones acides et 615-4 nm pour les zones basiques. Le actère de chaque produit détermine uite un spectre plus ou moins déplacé s l'une de ces deux longueurs d'ondes g. 5-3 et 4), ce qui permet d'obtenir des egistrements respectifs avec absorce positive ou négative (fig. 6) (5).

4) Les phénols végétaux : analyse directe en ultra-violets, sans révélation chimique

La révélation chimique des phénols végétaux, pour être suffisamment universelle exige 3 pulvérisations successives de réactif à la para-nitraniline diazotée (5) (6). Les colorations obtenues sont parfois très faibles (acide para-coumarique, acide cinnamique) et généralement instables, donc peu favorables à l'analyse quantitative.

Nous avons donc entrepris de dresser un atlas des propriétés chromatographiques et spectrales des composés phénoliques naturels par analyse directe dans l'Ultra-Violet, en phase solide (sans révélation chimique).

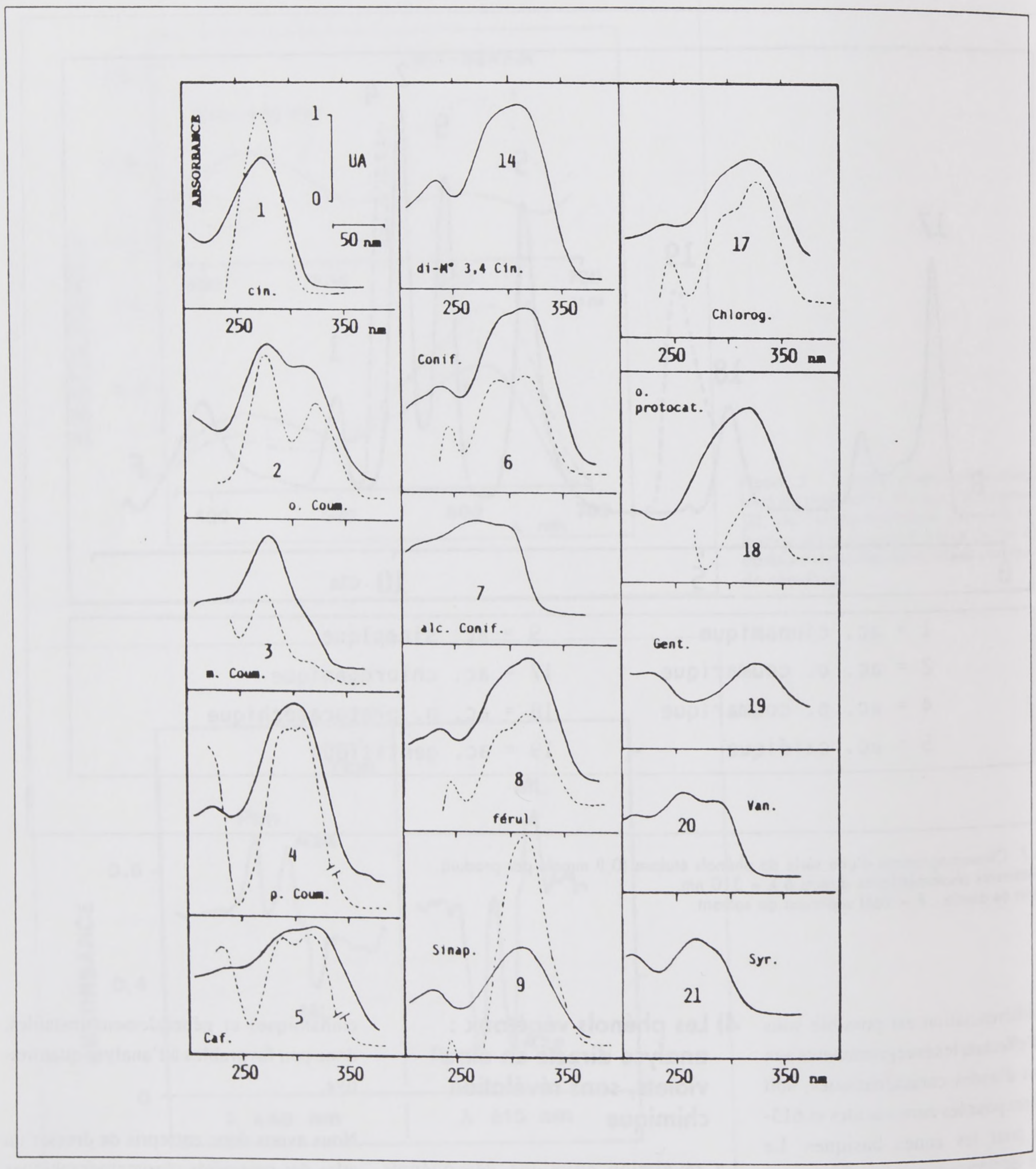


Figure 8 : Spectres d'absorbance en phase solide (gel de silice : traits continus) et en phase liquide (éthanol : pointillés), d'une série de dérivés phénoliques des acides cinnamique (1 à 11) et benzoïque (12 à 15).
Les composés sont désignés par leurs numéros comme précisé dans le texte.
λ = longueurs d'ondes ; UA = unités d'absorbance.

149

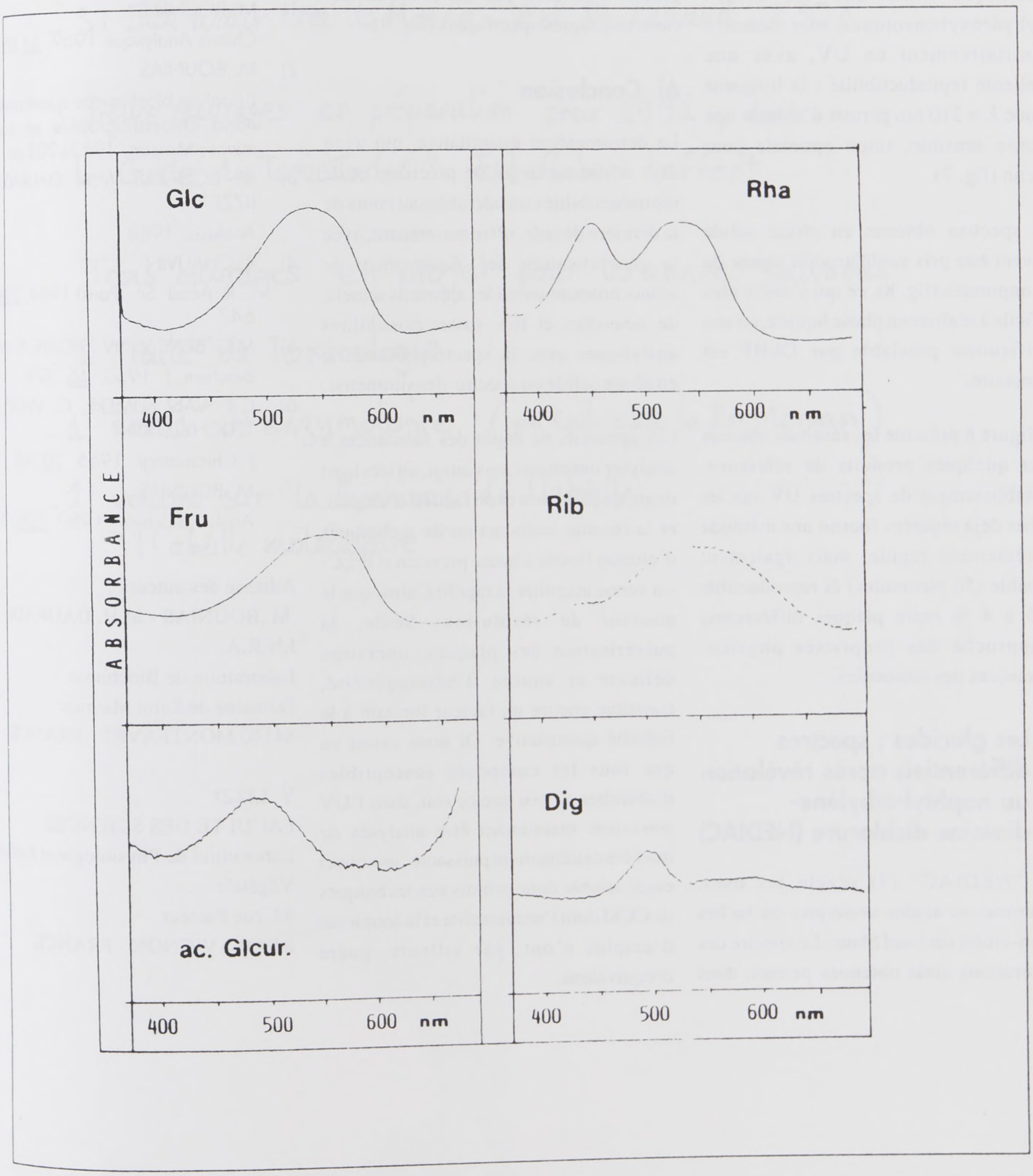


Figure 9 : Spectres comparés de divers composés glucidiques et dérivés après révélation sur couches de gel de silice au moyen du réactif au N-1 Naphtyl-éthylène diamine dichlorhydrate.

150

Tous les dérivés de l'acide trans-cinnamique ainsi que les acides polyhydroxybenzoïques sont détectés quantitativement en UV, avec une excellente reproductibilité : la longueur d'onde $\lambda = 310$ nm permet d'obtenir une réponse sensible, sinon optimale pour chacun (fig. 7).

Les spectres obtenus en phase solide peuvent être pris sur le produit séparé de ses impuretés (fig. 8), ce qui s'avère plus difficile à réaliser en phase liquide, où une purification préalable par CLHP est nécessaire.

La figure 8 présente les résultats obtenus pour quelques produits de référence. L'établissement de spectres UV sur les taches déjà séparées fournit une méthode extrêmement rapide, mais également sensible (50 picomoles) et reproductible (0,5 à 4 % entre plaques différentes) d'approche des propriétés physico-chimiques des molécules.

5) Les glucides : spectres différentiels après révélation au naphtyl-éthylène-diamine dichlorure (NEDIAC)

Le "NEDIAC" (7) révèle les oses, osamines et acides uroniques en taches brun-violet sur fond blanc. Le spectre des colorations ainsi obtenues permet, dans un certain nombre de cas, d'assigner aux glucides révélés par ce procédé des caractéristiques spécifiques (fig. 9).

6) Conclusion

La densitométrie quantitative, qui avait déjà atteint un degré de précision et de reproductibilité considérables au cours de la dernière décade, offre maintenant, avec la généralisation de l'équipement de monochromateurs sur les appareils actuels, de nouvelles et très vastes possibilités analytiques avec la spectrophotométrie en phase solide ou spectro-densitométrie.

Les appareils de dépôt des substances à analyser ont atteint, eux aussi, un très haut degré de précision et de facilité d'emploi, et la récente introduction de techniques d'élution forcée à haute pression (OPLC) est venue accroître la rapidité, ainsi que le pouvoir de résolution. Seule, la pulvérisation des plaques, opération délicate et source d'hétérogénéité, constitue encore un facteur limitant à la fiabilité quantitative. Or nous avons vu que tous les composés susceptibles d'absorber, si peu que ce soit, dans l'UV pouvaient maintenant être analysés de manière extrêmement puissante : un nouvel essor semble donc promis aux techniques de CCM dont l'universalité et la souplesse d'emploi n'ont, par ailleurs, guère d'équivalent.

Bibliographie

1) M. BOUNIAS
Chimie Analytique 1969, 51 (2), 76

2) M. BOUNIAS
L'Analyse biochimique quantitative par nano chromatographie en couche mince, Masson, 1983, 205 pp

3) M. BOUNIAS, M.H. DAURADE, Y. LIZZI
Analusis, 1988

4) R. CHAUVIN
C.R. Acad. Sc. (Paris) 1984, 299 (III), 647

5) M.G. BRAY, W.W. THORPE, K. WHITE
Biochem. J. 1950, 46, 271

6) C.E. VAN SUMERE, G. WOLF, H.J. TEUCHY, J. KINT
J. Chromatogr. 1965, 20, 48

7) M. BOUNIAS
Analyt. Biochem. 1980, 106, 29

Adresse des auteurs :
M. BOUNIAS - M.H. DAURADE
I.N.R.A.
Laboratoire de Biochimie
Domaine de Saint Maurice
84140 MONTFAVET - FRANCE

Y. LIZZI
FACULTE DES SCIENCES
Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétale
33, rue Pasteur
84000 AVIGNON - FRANCE

LIVRES

Deux ouvrages édités au cours de 1990:

- "La Création de la Vie ..." Ed du Rocher - 444 p
- "Si Dieu avait créé le Monde" Ed. Ph. Lebaud - 230 p

Deux ouvrages en préparation pour 1991, dont:

- "Le Guide des Toxicitudes" Ed. Robert Laffont

Trois ouvrages en projet pour les années suivantes:

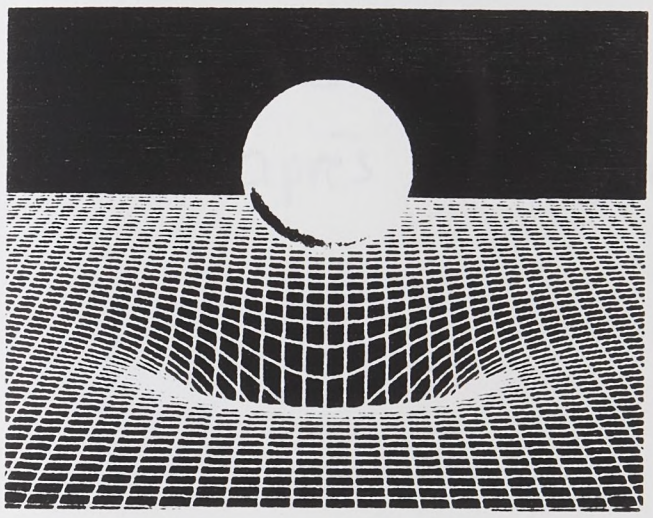
- 1 Traité de Toxicologie
- 1 Traité d'enzymologie (en coll. avec le Dr. Morgan)
- 1 volume sur la biochimie de l'abeille:
  "L'abeille moléculaire"

l'Esprit et la Matière

La Création de la vie:

de la matière à l'esprit

Michel Bounias



Editions du Rocher

Quelle est la nature profonde du phénomène vivant ? La vie est-elle accidentelle, déterminée, finalisée, nécessaire ou simplement inéluctable ? L'esprit, l'âme et leurs manifestations en sont-ils un authentique prolongement ou ne reflètent-ils que des constructions de la pensée, des illusions ?

Michel Bounias étudie, explique – avec humour souvent – les structures les plus fondamentales de l'univers physique et le rôle que vient y jouer la Vie. Le vivant est fait de particules et se nourrit d'ondes ; parvenir à le comprendre c'est avant tout être capable de reconstituer le scénario de sa création, sans laisser subsister de lacune. Tel est le projet de ce livre.

Michel Bounias a élaboré trois parties s'enchaînant un peu à la manière des trois mouvements d'une symphonie : la Matière, l'émergence de la Vie et l'Esprit.

Le premier serait un *scherzo*, durant lequel l'univers tisse allègrement la trame de la Matière à partir d'un fil qui permet au lecteur de visualiser de manière simple et très figurative des structures et des propriétés décrites jusqu'ici sous une forme abstraite et insaisissable. Le deuxième mouvement évolue d'un *andante* à un *largo* : tout d'abord les molécules primordiales s'affairent à construire des rudiments de cellules aussi primitives qu'éphémères, puis, sans l'aide du hasard, se mettent en place les mécanismes biochimiques essentiels (code génétique, respiration, photosynthèse, phosphorylation,...) toujours à la base de cellules vivantes actuelles donc de la Vie. Dans le troisième, l'*adagio* final, le lecteur découvre comment les courbures de l'espace qui ont modelé la Matière ont pu s'estomper, se convertir en vibrations et laisser place à une nouvelle sorte de structure (appartenant toujours à l'univers physique) : l'Esprit.

Michel Bounias est un éminent biochimiste, de notoriété internationale, directeur de recherches à l'INRA, professeur associé à l'Université d'Avignon, de Belgrade et de Québec.

52806-7
2 268 00 872X

9 782268 008721

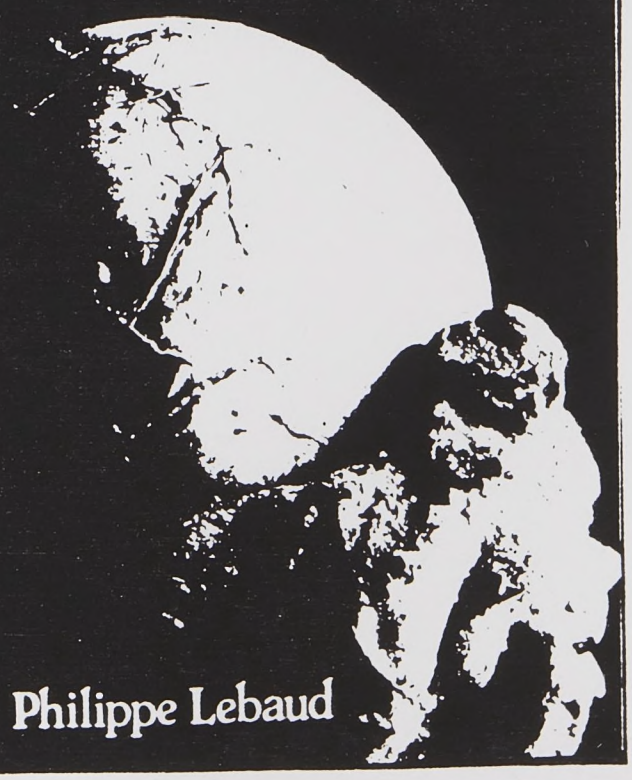
150 F

maquette : R. Begey
illustration de la couverture : Orion © Fotogram-stone

Michel Bounias

SI DIEU AVAIT CRÉÉ LE MONDE

Preface
de Jacques Lacarriere



Philippe Lebaud

SI DIEU AVAIT CRÉÉ LE MONDE

Après des années d'opposition entre science et religion, le problème de l'existence de Dieu n'est plus aussi résolument écarté par les scientifiques.

Michel Bounias ne cherche pas à déduire cette existence des recherches actuelles sur la naissance et l'évolution de l'univers. Il prend le parti de la considérer comme une hypothèse qu'il va intégrer aux connaissances scientifiques.

Si Dieu a créé le monde, a-t-il pu ensuite intervenir dans son élaboration, modifier l'Histoire et agir sur la vie des hommes comme ceux-ci n'ont cessé de l'imaginer ?

Le livre de Michel Bounias, qui s'adresse à toutes les convictions, explore la fragile frontière qui sépare la croyance du savoir.

Michel Bounias, biochimiste et biophysicien, directeur de recherche à l'INRA, est l'auteur de *La Création de la Vie* paru aux Éditions du Rocher.

Philippe Lebaud

ISBN 2 86594 061 6

9 782865 940615

120 F

09 90 902928 6

Sculpture d'Anita Tullio Photo Baxter

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

1° Bilan des dépenses.

2° Redéploiement du matériel : Etat des lieux après les changements d'affectations.

BILAN DES DÉPENSES

Matériel et fournitures de Laboratoire ... :	6 939,83
Déplacements et missions ..... :	4 111,80
Tirés à part et thèses (frais de publications) ... :	8 665,83
Livres, revues, abonnements ..... :	6 298,38
Photocopies ..... :	8 732,65
Contrats d'entretien Bureautique ..... :	2 597,40
Frais de dactylographie ..... :	640,00
Fournitures de bureau et informatique ... :	6 871,06
Affranchissement du courrier ..... :	4 983,12
Téléphone ..... :	8 585,80
TOTAL GÉNÉRAL	58 425,87 F
à déduire : 2/12 de part chercheur *	8 333,33
BILAN :	50 092,54

* équivalent de 2 mois (janvier + février) précédant la décision de changement d'affectation de l'intéressé - NB : celui-ci a, néanmoins, continué à occuper les locaux et puiser sans retenue dans les équipements du LBC, par la suite -

ANNEXE -

ETAT DES LIEUX APRÈS LES CHANGEMENTS D'AFFECTATIONS -

L'ingénieur I.E. rattaché rétroactivement au Laboratoire de Pollution ("pour avoir davantage de crédits") s'est réservé l'usage d'une quantité de matériel d'équipement qu'il a sorti du Laboratoire (et dont il a fourni la liste). Lui-même et ses stagiaires ont laissé les locaux dans un état de saleté et de pillage consternants.

Exemples:

- disparition de plus de 50% de la petite verrerie - une part laissée cassée
- agitateurs magnétiques tous hors d'usage
- balances endommagées (frais de réparations répété)
- Microseringues : 21 cassées, grippées ou disparues sur 38
- Cuves spectrophotométriques : 8 cassées ou manquantes sur 20
- Micro erlens : 100% disparus ou cassés
- Tubes de Borrel : 8 intacts sur 60 (86% de perte)
- Cagettes altuglas pour abeilles : 8 disparues sur 12
- Produits chimiques : non rangés, flacons souillés d'impuretés, stocks non tenus à jour, flacons non étiquetés, pissettes cassées laissées en l'état, etc.
- Ouvrages de bibliothèque et périodiques scientifiques "empruntés" sans témoins et non restitués
- Paillasses et matériels encombrés et maculés de déchets acides ayant attaqué les structures de bois et de métal -
- Aucune tenue à jour des fichiers ni aucun signalement de l'utilisation (cahiers de fonctionnement) du matériel ni des remplacements à prévoir (état des stocks : néant !)
- Perturbations et détériorations apportées aux ordinateurs du Laboratoire (1 disque dur détruit, logiciels et données effacés...)

Cet état de fait, ainsi que les vols (documents du Dr Morgan, Calculatrices, sac et papiers d'identité de Mme Nectoux, tableau de commande de l'imprimante d'ordinateur dans la pièce n°4, etc.) ont été facilités par l'absence de serrures, puis par le retrait (à la demande de l'ingénieur IE concerné) des verrous posés au 15 juin par les services du Centre, après intervention de l'intéressé "en haut lieu" (les intervenants ont "pris leurs responsabilités" - le bilan est sans équivoque) -

Matériel resté au Laboratoire. (Prix d'achat)

1 densitomètre CS930 (90 000 F)
1 spectrophotomètre Kontron (75 000 F)
1 pH mètre AMES (1500 F)
1 acrylophor PLEUGER (2 500 F)
1 applicateur CCM (12 000 F)
1 Etuve CCM (5000 F)*
2 Hottes mobiles à filtres (~ 15 000 F)
1 bain thermostaté (5000 F)*
2 balances (20 000 F)
1 centrifugeuse Jouan (~ 20.000 F)

TOTAL : ~ 246 000 F soit moins de 30% du parc attribué au LBC

Matériel "sorti" du Laboratoire.

1 ensemble d'électrophorèse sur plaque (52 000 F)
1 ensemble de chromatographie basse pression (19500 F + accessoires)
1 Ultracentrifugeuse Beckman (280 000 F)
1 centrifugeuse "microfuge" (20 000 F)
1 ensemble HPLC "Waters" complet, avec :
double détection (U.V. et refractométrie) et 2 enregistreurs (> 120 000 F)
1 compteur de Radioactivité γ Kontron (60 000 F)
1 bain thermostaté (5000 F) + pipettes automatiques, etc.

TOTAL : > 556 500 F (à rembourser : facture ci-jointe)

NB. La pièce occupée par l'ingénieur I.E. (communicante avec le bureau de M. Bounias) doit être RESTITUÉE au LBC.

* achats sur ressources privées
le reste sur ressources propres au LBC

UNIVERSITE D'AVIGNON
&
INRA

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
Centre de Recherche d'Avignon
Domaine St-Paul, BP 91
84143 MONTFAVET CEDEX

République Française
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Ministère de l'Agriculture

Département de
Phytopharmacie et Ecotoxicologie
Station d'Avignon
AVIGNON-PHYTECO : 21-531
Tél. 90.31.60.58
Télex : INRAAVI 432870F
Fax Avignon : 90.31.62.98

(C.R.Ann. LBC 19, 1990)

160

FACTURE

N/Réf. MB/MB/90/801

DOIT : Laboratoire de Pollution

Reliquat contrat SOPRA	40 000, F
Rectification erreurs d'attribution	
– pour 1989-90	50 000, –
– 2/12 de part chercheur	
pour M. Belzunces (Janv. + Fév. 1990) ...	8 333, –
Cession de matériel scientifique .	556 500, –
Total	**654 833, F** *

* montants initiaux, non réévalués au titre de l'érosion monétaire

En votre règlement par cession interne, SVP

Dr. M. BOUNIAS

c/c. M. l'ordonnateur du Centre de Recherches d'Avignon
M. le Chef de Dépt de Phytopharmacie et d'Ecotoxicologie

BILAN DES PUBLICATIONS
PAR SECTEURS DE COLLABORATIONS

A - Avec l'ETRANGER

1° Yougoslavie (Univ. de Belgrade : Prof. Popeskovic)
J. Apic. Res. 28, 201-207 (1990)

2° Grande Bretagne (Univ. de Lancaster, Dr. Morgan)
Bio Math.: Soumis
J. Apic. Res. : Soumis

3° Allemagne (Univ. de Ulm : Prof. Maier)
Diabete & Metabolisme 16, 428-434 (1990)
Z. Biol. Chem., Hoppe Seyler, 371 771-828 (1990)

4° Espagne (Univ. de Grenade : Dr. Vargas)
J. Biol. Chem., accepté le 26-03-90

5° Maroc (Inst. Hassan II - H. Mohssine)
Chronobiologia 17, 201-206.

6° Pologne (Univ. Szczecin : Prof. Kruk)
Coll. Internat. Milan : soumis

B - En France

1° Univ. d'Avignon (Prof. Coulomb)(Mlle Lorient)(M. Lizzi)
C.R. Acad. Sc., 310 III, 1-6.
Cahiers de chromatog., 14, 66-74.

2° Univ. de Montpellier (Prof. Vivarès)
7e Congr. Internat. Parasitol. Paris (Août 90)

3° Univ. de Paris (Dr. Bonaly)
Coll. Soc. Biol. 28-11-1990 (CNRS Montpellier)

4° Divers INRA
C.R. Soc. Biol., 184, 114-122.

TSVP-

C.R.Ann. 19, 1990

5° Laboratoire Seul

Chromatographia : Soumis

Analusis : 18, 11-12 (1990)

" " 18, 13-14 (1990)

Recherches conceptuelles spécifiques
(Prof. Bounias)

- J. Enzyme Inhibition 3, 323-326 (1990)
- C.R. Acad. Sc. 310 III, 65-70 (1990)
- J. Sc. Expl. 4, 1-18 (1990)

+ 3 livres.

+ 2 Thèses